

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

EP 99/00159

EJU

REC'D	05 MAR 1999
WIPO	PCT

Die B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rezeptorbindungsassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern sowie Reagenzien und Reagenziensatz für die Durchführung eines solchen Rezeptorbindungsassays"

am 15. Januar 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/564 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. Januar 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wehner

Aktenzeichen: 198 01 319.1

11.10.99

Dipl.-Chem. Dr. Steffen ANDRAE
Dipl.-Phys. Dieter FLACH
Dipl.-Ing. Dietmar HAUG
Dipl.-Chem. Dr. Richard KNEISSEL
Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing. Friedrich BAUER
Dipl.-Biochem. Dr. Michael SCHNEIDER
Balanstraße 55
D-81541 München

Akte: 2769
Anmelderin: B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH

5

Rezeptorbindungsassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern sowie Reagenzien und Reagenziensatz für die Durchführung eines solchen Rezeptorbindungsassays

15

Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Rezeptorbindungsassays zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TSHR-Auto-Ab), die bei Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen, insbesondere beim Morbus Basedow, auftreten.

20

Es ist bekannt, daß zahlreiche Erkrankungen, an denen die Schilddrüse beteiligt ist, Autoimmunerkrankungen sind, bei denen Autoantikörper gegen molekulare Strukturen der Schilddrüse gebildet werden, die im Zusammenhang mit der Erkrankung beginnen, als Autoantigene zu wirken. Die wichtigsten bekannten Autoantigene der Schilddrüse sind dabei Thyreoglobulin (Tg), die Schilddrüsenperoxidase (TPO) und insbesondere der TSH-Rezeptor (TSHR) (vgl. Furmaniak J et al., Autoimmunity 1990, Vol. 7, S. 63-80).

25

30

Der TSH-Rezeptor ist ein in der Schilddrüsenmembran lokalisierter Rezeptor, an den das von der Hypophyse ausgeschüttete Hormon TSH (Thyroid-stimulierendes Hormon oder Thyreotropin)

bindet und dadurch die Ausschüttung der eigentlichen Schilddrüsenhormone, insbesondere des Thyroxins, auslöst. Der TSH-Rezeptor gehört zur Rezeptor-Familie der G-Protein-gekoppelten Glykoprotein-Rezeptoren mit einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, zu der auch der LH/CG- und der FSH-Rezeptor gehören. Eine Aufklärung der chemischen Struktur des TSH-Rezeptors, d.h. der Sequenz der für ihn codierenden DNA sowie der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz des Rezeptors selbst, gelang Ende 1989 (vgl. Libert F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1250-1255; Nagayama Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1184-1190; vgl. auch EP-A-0433509 bzw. WO-A-91/09121; sowie WO-A-91/09137; WO-A-91/10735 und WO-A-91/03483; ferner Yuji Nagayama & Basil Rapoport, in: Molecular Endocrinology, Vol. 6 No. 2, S. 145-156 und die darin zitierte Literatur).

Es ist allgemein bekannt, daß bei der als Morbus Basedow (englisch: Graves' disease) bekannten Schilddrüsen-Autoimmunerkrankung stimulierende Autoantikörper eine Rolle spielen, die gegen den TSH-Rezeptor gebildet werden und mit diesem so wechselwirken, daß die Schilddrüse stimuliert wird, was sich als Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose) äußert. Die Bestimmung von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor hat somit für die Diagnose des Morbus Basedow eine erhebliche klinische Bedeutung.

TSHR-Auto-Ab werden in biologischen Proben bisher im wesentlichen nach zwei Verfahrensprinzipien bestimmt (vgl. z.B. Morgenthaler N.G. et al., J Clin Endocrinol Metab 81: 3155-3161 (1996)):

Bei Zellstimulationstests äußert sich die Anwesenheit von stimulierenden TSHR-Auto-Ab, die in der Literatur häufig mit der Abkürzung TSI (TSI = thyroid stimulating immunoglobulins) bezeichnet werden, dadurch, daß bestimmte Funktionen von geeigneten Zellen, die in ihrer Zellmembran natürliche oder rekombinante TSHR aufweisen und mit einer Autoantikörper

enthaltenden Probe in Kontakt kommen, durch Stimulation ausgelöst oder verstärkt werden, insbesondere die Bildung von cAMP (cyclischem Adenosinmonophosphat). Bei diesen auch als Bioassays bezeichneten Tests wird selektiv die stimulierende Wirkung gemessen, die Messung ist jedoch außerordentlich aufwendig und daher für die klinische Routinediagnostik wenig geeignet.

Alternativ dazu können Autoantikörper auch unter Verwendung von kompetitiven Rezeptorbindungsassays, insbesondere Radiorezeptorassays, bestimmt werden, z.B. unter Verwendung des TRAK-Assay® der B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH. Zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TSHR-Auto-Ab) wird nach diesem herkömmlichen Verfahren so vorgegangen, daß man die zu bestimmenden Autoantikörper aus einer Serumprobe in flüssiger Phase mit einem radioaktiv markierten bovinen TSH (^{125}I -bTSH) um die Bindungsstellen eines solubilisierten porcinen TSH-Rezeptors (porc.TSHR) konkurrieren läßt (vgl. Southgate, K. et al., Clin. Endocrinol. (Oxford) 20, 539-541 (1984); Matsuba T. et al., J.Biochem. 118, S.265-270 (1995); EP 719 858 A2; Produktinformation zum TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH). Um das an die porc.TSHR-Präparation gebundene ^{125}I -bTSH zu bestimmen, wird nach Abschluß der Inkubation der eingesetzte solubilisierter porc.TSHR mit einem Fällungsreagens und einem anschließenden Zentrifugierschritt von der flüssigen Phase abgetrennt. Die Bestimmung des Rezeptor-gebundenen ^{125}I -bTSH erfolgt durch Messung der im Sediment gebundenen Radioaktivität. Da die Bestimmung auf einer Konkurrenz (Kompetition) zwischen ^{125}I -bTSH und den zu bestimmenden Autoantikörpern um gemeinsame Bindungsstellen auf dem porc.TSHR beruht, werden bei diesem Verfahren alle solchen und nur solche Autoantikörper erfaßt, die tatsächlich mit bTSH kompetieren. Solche kompetierenden, zur Inhibierung der TSH-Bindung befähigten Autoantikörper werden in der Literatur auch als TBII (TBII = thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulin) bezeichnet, und das Ausmaß ihrer Aktivität wird auch als prozentuale sogenannte TBII-Aktivität angegeben.

Die bisher bekannten kompetitiven Radiorezeptorassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern weisen verschiedene Nachteile auf, die auf die Qualität bzw. Verfügbarkeit der verwendeten Assaykomponenten, in den Seren einzelner Patienten vorkommende Anomalitäten, die in den bekannten Assays die Meßergebnisse verfälschen können, sowie darauf zurückzuführen sind, daß die Bindungsfähigkeit von TSH-Rezeptorpräparationen generell sehr empfindlich auf Veränderungen des Rezeptors oder der von ihm gebundenen Biomoleküle reagiert. Die Bindung von Biomolekülen von peptidischer oder proteinischer Natur, z.B. von Hormonen oder auch Autoantikörpern, an Rezeptoren ist in der Regel sehr komplexer Natur, und die Ausbildung einer spezifischen Bindung zwischen Rezeptor und Biomolekül ist sehr viel empfindlicher gegenüber strukturellen Veränderungen insbesondere des Rezeptors, als das bei einem üblichen Bindungspaar Antigen/Antikörper der Fall ist, das Grundlage der meisten Immunoassays ist, bei denen Rezeptoren keine Rolle spielen. Versuche, den TSH-Rezeptor zu immobilisieren und/oder zu markieren, führten bisher in der Regel zu strukturellen Veränderungen, die die Funktionalität des Rezeptors stark beeinträchtigen. Das hat zur Folge, daß bisher kaum nacharbeitbare Beschreibungen einer praktischen Umsetzung zahlreicher Assay-Grundtypen, die bei Immunoassays unter Ausnutzung einer Antikörper/Antigen-Bindung zur Verfügung stehen, für den Fall von Rezeptorbindungsassays zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab veröffentlicht wurden, so daß derartige andere Assaytypen in der Praxis für die TSHR-Auto-Ab-Bestimmung noch nicht genutzt werden können. Das gilt insbesondere für solche Assaytypen, bei denen mit immobilisierten Bindungspartnern gearbeitet wird und am Ende der Messung direkt die Konzentration einer an eine Festphase gebundenen Markierung bestimmt wird oder bei denen zur Markierung voluminöse Moleküle wie Enzyme, Enzymsubstrate oder Chemilumineszenzlabel verwendet werden. Da die Messung einer an eine Festphase gebundenen Markierung Grundlage der meisten Assay-Automaten für Reihemessungen ist, sind die bekannten Assays zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörper-

pern bisher nicht auf derartigen Automaten durchführbar.

In dem Patent DE 43 28 070 C1 ist ein Typ eines Rezeptorbindungsassays, der nach der Coated-Tube-Technik arbeitet, beschrieben, bei dem die Schwierigkeit der Herstellung von markierten bzw. immobilisierten funktionalen Rezeptorpräparationen dadurch umgangen wird, daß man an die Festphase Bestandteile eines kompetitierenden Reaktionsystems bindet, das gewissermaßen einen "Schatten" der eigentlichen Rezeptorbindungsreaktion darstellt. Für die Schaffung von Assays für die klinische Routinediagnostik hat sich das offenbarte Verfahrensprinzip jedoch als zu kompliziert und daher wenig praktikabel erwiesen. Auf die allgemeinen Ausführungen in der genannten Patentschrift zur Problematik von Rezeptorbindungsassays im allgemeinen und von solchen zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern im speziellen wird ergänzend ausdrücklich Bezug genommen.

Aus der EP-B-0 488 170 sind zellfreie Rezeptorbindungstests bekannt, bei denen rekombinante Fusionsrezeptoren aus einem aminoterminalen Rezeptorprotein und einem Trägerprotein, insbesondere dem konstanten Teil (Fc) der schweren Kette eines Immunglobulins, eingesetzt werden, die mittels eines Antiserums oder eines monoklonalen Antikörpers an eine feste Phase gekoppelt sind. Die diskutierten Rezeptoren gehören nicht zur Klasse der hochmolekularen G-Protein gekoppelten Glykoprotein-Rezeptoren. Ferner ist eine Immobilisierung durch Bindung eines Trägerproteins, das der Fc-Teil eines Immunglobulins ist, für Rezeptorbindungsassays, mit deren Hilfe Autoantikörper bestimmt werden sollen, wenig geeignet, da die Autoantikörper selbst zu den Immunglobulinen gehören und an das Immobilisierungssystem binden können.

Bestimmte Nachteile der herkömmlichen Assays haben auch damit zu tun, daß zur Bestimmung humaner TSHR-Auto-Ab Reaktionspartner unterschiedlicher tierischer Herkunft, d.h. solubilisierete porcine TSHR-Präparationen in Verbindung mit markiertem

bTSH, verwendet wurden. Die genannten Assaykomponenten zeichnen sich zwar durch eine gute gegenseitige Bindung aus und ermöglichen eine Erfassung z.B. von etwa 80% bis 90% der bei Morbus Basedow vorkommenden humanen TSHR-Auto-Ab. Die gegenüber einer 100%igen Erfassung der nachzuweisenden TSHR-Auto-Ab verminderte klinische Wertigkeit ist jedoch vermutlich mindestens teilweise auch darauf zurückzuführen, daß die in Patientenserum vorkommenden Autoantikörper gegen den humanen TSHR gerichtet sind, jedoch aufgrund ihrer Bindung an eine porcine TSHR-Präparation bestimmt werden. Trotz der grundsätzlichen Verfügbarkeit von rekombinant erzeugten humanen TSHR-Präparationen (rhTSHR) wurden derartige rhTSHR in klinischen Assays noch nicht eingesetzt, da evtl. zu erwartende Vorteile durch zahlreiche neue praktische Nachteile entwertet wurden. Insbesondere war es bisher genausowenig wie im Falle des porc.TSHR möglich, einen funktionalen, nativen rhTSHR in Assays in festphasengebundener (immobilisierter) oder markierter Form einzusetzen.

Aus den Veröffentlichungen W.B.Minich, M.Behr, und U.Loos, Exp Clin Endocrinol Diabetes 105, 282-290 (1997) sowie "70th Annual Meeting of the American Thyroid Association", 15.-19.10.1997, Abstract No. 89 bzw. W.B. Minich, J.D.Weymayer, U.Loos, Thyroid, Vol.8, 3-7 (1998) (im Druck) ist es bekannt, daß es möglich ist, einen rekombinanten humanen Fusions-TSHR über einen gentechnologisch angefügten Peptidrest zu immobilisieren und in dieser Form in TSHR-Auto-Ab-Bestimmungen zu verwenden. Eine entsprechende zusammenfassende Offenbarung findet sich auch in der noch nicht veröffentlichten Internationalen Anmeldung PCT/EP97/06121.

In der EP-A 0 719 858 wird ferner ein Verfahren zur Herstellung eines funktionalen rhTSHR mit Hilfe einer Myelom-Zelllinie beschrieben. Die Anmeldung erwähnt in allgemeiner, spekulativer Form die Möglichkeit, unter Verwendung des hergestellten rhTSHR-Polypeptids monoklonale Antikörper zu erzeugen, und macht den Vorschlag, solche Antikörper u.a. zur Immobilisierung

des rhTSHR zu verwenden und davon bei der Bestimmung von TSHR-Auto-Ab Gebrauch zu machen. Es wird jedoch weder die tatsächliche Herstellung und Selektion derartiger monoklonaler Antikörper beschrieben, noch wird konkret gezeigt, daß es dem Vorschlag entsprechend tatsächlich möglich ist, mit den ggf. erhältlichen monoklonalen Antikörpern einen rhTSHR ohne Funktionalitätsverlust zu immobilisieren und in dieser Form bei der Bestimmung von TSHR-Auto-Ab zu nutzen. Die Offenbarung von EP-A 0 719 858 ist insoweit nicht nacharbeitbar. In der zugrunde liegenden wissenschaftlichen Veröffentlichung (Matsuba et al., J.Biochem.118, S.265-270 (1995)) werden monoklonale Antikörper nicht erwähnt.

Nachdem die Molekülstruktur des TSH-Rezeptors aufgeklärt war, wurden mit dem Ziel der Aufklärung der für die TSH-Bindung und die Antikörperbindung zuständigen Epitope des TSH-Rezeptors von zahlreichen Arbeitsgruppen monoklonale und polyklonale Antikörper gegen vollständige rhTSHR-Polypeptide, gegen den (ohne das Signalpeptid 398 Aminosäuren umfassenden) N-terminalen extrazellulären Teil solcher Rezeptoren und gegen Konjugate kürzerer Rezeptorpeptid-Teilsequenzen hergestellt (vgl. z.B. N.G.Morgenthaler et al., J Clin Endocrinol Metab 81: 3155-3161 (1996); Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 134, No. 2, S. 549-554 (1994); Desai RK et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 77:658-663, 1993; Dallas JS et al., Endocrinology 134, No. 3, S. 1437-1445 (1994); Johnstone AP et al., Mol. Cell. Endocrinol. 105 (1994), R1-R9; Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 136, No. 7, S. 2817-2824 (1995); Nicholson LB et al., J. Mol. Endocrinol. (1996) 16, S. 159-170; Ropars A et al., Cell. Immunol. 161, S.262-269 (1995); Ohmori M et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, No.1 (1991), S.399-403; Endo T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, No.3 (1991), S.1035-1041; Costagliola S et al., Endocrinology 128, No.3, S.1555-1562, 1991; Marion S et al., Endocrinology 130, No.2, S.967-975 (1992); J. Sanders et al., J. Endocrinol. Invest. 19 (Suppl. No.6); 1996 und weitere, in den genannten Literaturstellen zitierte Veröffentlichungen). Die verschiedenen Antikörper

wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber dem TSH-Rezeptor bzw. rekombinant erzeugten Teilsequenzen davon und insbesondere auch im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die Bindung von TSH an verschiedene Formen bzw. Fragmente des TSH-Rezeptors zu stören, geprüft. Da die verschiedenen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper durch Immunisierung unterschiedlicher Tiere und/oder unter Verwendung von rekombinantem Material aus unterschiedlichen Expressionssystemen erzeugt worden waren und außerdem bei den Bindungstests häufig rekombinant erzeugte TSH-Rezeptoren unterschiedlichen Ursprungs bzw. Teilpeptide davon verwendet wurden, und da es sich ferner herausstellte, daß für die Bindung zahlreicher Antikörper die Glykolisierung und/oder korrekte Faltung der Rezeptorpeptide entscheidend sein dürfte, ist die Epitopstruktur von nativen TSH-Rezeptoren und das epitopspezifische Bindungsverhalten der in den polyklonalen Autoantikörperpopulationen humaner Seren vorkommenden Autoantikörpern noch nicht umfassend geklärt.

In der Veröffentlichung Dallas JS et al., Endocrinology 134, No. 3, S. 1437-1445 (1994) wird beispielsweise ein mit Hilfe des Baculovirus/Insektenzellen-Expressionssystems hergestellter partieller rekombinanter TSH-Rezeptor, der die Aminosäuren der extrazellulären Domäne des humanen TSH-Rezeptors ohne das N-terminale Signalpeptid aufweist, dazu verwendet, Kaninchen zu immunisieren, und aus den gebildeten Immunglobulinfraktionen werden affinitätschromatographisch unter Verwendung synthetischer Peptide mit jeweils ca. 20 Aminosäuren spezifische Antikörperfraktionen gewonnen. Diese werden dann u.a. auf ihre Eignung untersucht, in einem kommerziellen Rezeptorbindungsassay die Bindung von TSH einen solubilisierten porcinen TSH-Rezeptor zu blockieren. Die Antikörper zeigten keine stimulatorische Aktivität.

In der Veröffentlichung Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 136, No. 7, S. 2817-2824 (1995) wird beschrieben, wie der gleiche partielle rekombinante TSH-Rezeptor wie in der vorstehenden Veröffentlichung zur Immunisierung von Mäusen und

zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen einzelne Epitope des TSH-Rezeptors nach Standardtechniken eingesetzt wurde. Eine ähnliche Vorgehensweise ist beschrieben in Nicholson LB et al., J. Mol. Endocrinol. (1996) 16, S. 159-170.

5

Gemäß Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 134, No. 2, S. 549-554 (1994) wird ein wie vorstehend hergestellter partieller rekombinanter TSH-Rezeptor nachträglich gefaltet und nunmehr auf seine Eignung getestet, radioaktiv markiertes bTSH zu binden. Dazu wird er in flüssiger Phase mit radioaktiv markiertem bTSH umgesetzt. Um den entstandenen Komplex möglichst

10

quantitativ aus der Reaktionsmischung abzutrennen, wird dann als Teil eines Fällungssystems ein Antikörper zugesetzt, der durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Konjugat eines Teilpeptids, das die Aminosäuren 357 bis 372 der vollständigen TSH-Rezeptorsequenz enthält, erzeugt wurde und von dem festgestellt worden war, daß er die Bindung von bTSH an den ungefalteten partiellen rekombinanten TSH-Rezeptor nicht inhibierte (Desai RK et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 77:658-663, 1993). Der zugesetzte Antikörper bzw. die ihn und gebundenes radioaktiv markiertes bTSH enthaltenden Komplexe werden dann mit Hilfe von Protein A, das unspezifisch an jegliche Antikörper bindet, ausgefällt. Unter den Versuchsbedingungen scheint die Bindung von Protein A an den rezeptorgebundenen Antikörper die gleichzeitige bTSH-Bindung nicht zu beeinträchtigen.

15

20

In der älteren, nicht vorveröffentlichten Patentanmeldung 196 51 093.7 wird ferner erstmals ein praktisch funktionsfähiger kompetitiver Festphasen-Rezeptorassay zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab beschrieben, bei dem so gearbeitet wird, daß man die zu bestimmenden TSHR-Auto-Ab und markiertes bTSH bzw. ggf. auch einen markierten monoklonalen Antikörper um Bindungsstellen eines solubilisierten TSHR konkurrieren läßt und die gebildeten TSHR-Komplexe mittels eines immobilisierten monoklonalen Antikörpers an eine Festphase bindet. In der Anmeldung 196 51 093.7 werden dabei solche monoklonalen Antikörper, die relativ kurze Aminosäure-Sequenzen des TSHR erkennen, in

30

35

Verbindung mit cruden solubilisierten porcinen oder ggf. auch rekombinanten TSHR-Präparaten verwendet. Die Immobilisierung der TSHR-Komplexe erfolgt im Ausführungsbeispiel mit Hilfe einer Affinitätsgels, an das ein sequentieller monoklonaler Anti-hTSHR-mAb gebunden ist. Das Schwerkgewicht der Lehre der Anmeldung 196 51 093.7 liegt auf der Erhöhung der klinischen Wertigkeit der TSHR-Auto-Ab Bestimmung, insbesondere bei Verwendung der herkömmlichen cruden solubilisierten TSHR-Präparationen. Auf den Inhalt der genannten Anmeldung wird, insbesondere was mögliche Assayvariationen angeht, jedoch ergänzend ausdrücklich Bezug genommen.

Ein besonderes Verfahren zur Gewinnung von Anti-hTSHR-mAb ist ferner beschrieben von S.Costagliola und G.Vassart in J.Endocrinol.Invest. 20 (Suppl. to no.5), Abstract 4, (1997). Gemäß diesem Verfahren erfolgt eine Immunisierung von Mäusen zum Zwecke der Antikörperbildung nicht mit einem Antigen peptidischer Natur, sondern durch intramuskuläre Injektion eines für den hTSHR kodierenden DNA-Plasmidkonstrukts. Es werden auf diese Weise neue monoclonale Antikörper mit hoher Affinität zum nativen hTSHR erhalten. Diese Technik hat sich als sehr wertvoll erwiesen und wird auch im Rahmen der vorliegenden Anmeldung insbesondere zur Herstellung von Anti-hTSHR-mAb genutzt, die konformationelle Epitope erkennen.

Ergänzend sei angemerkt, daß die mit Antikörpern gegen rekombinante TSH-Rezeptoren oder deren Teile gewonnenen Erkenntnisse zu dem Vorschlag führten, zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern ein drittes, an sich bekanntes Verfahrensprinzip in Form eines Immunpräzipitationsassays zu nutzen, bei dem als Reagens zur Fällung eine Präparation eines extrazellulären Teils eines rekombinanten, durch Einbau von ³⁵S-Methionin markierten TSH-Rezeptors verwendet wird. Bei einem solchen Assay besteht weder eine Selektivität für TSI noch für TBII. (N.G.Morgenthaler et al., J Clin Endocrinol Metab 81: 700-706 (1996)). Die Herstellung des ³⁵S-markierten Rezeptors durch in vitro-Translation ist jedoch außerordentlich aufwendig

und teuer, und es gibt keine Meßgeräte, die für eine klinische Routinemessung der von ^{35}S emittierten Strahlung geeignet sind. Das Verfahren ist daher als Meßverfahren für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet.

5

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern zu schaffen, der die beschriebenen Nachteile derartiger kompetitiver Rezeptorbindungsassays des Standes der Technik nicht aufweist und von hoher klinischer Wertigkeit ist.

10

Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen verbesserten Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern zu schaffen, bei dem die aus den Reaktionspartnern des Bestimmungsverfahrens gebildeten TSH-Rezeptor-Komplexe direkt in festphasengebundener Form erhalten werden, so daß auch eine automatisierte Durchführung derartiger Rezeptorbindungsassays möglich wird.

15

Insbesondere ist es ferner Aufgabe der vorliegenden Erfindung, verbesserte Rezeptorbindungsassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern so zu gestalten, daß bestimmte Störungen der Messung durch anomale Serumbestandteile effektiv ausgeschaltet werden und eine optimale Bindung der Reaktionspartner des Bestimmungsverfahrens gewährleistet ist.

20

Es ist ferner Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die zur Durchführung derartiger verbesserter Rezeptorbindungsassays in der klinischen Routinediagnostik erforderlichen Reagenziensätze (Kits) zu schaffen.

30

Die genannten Aufgaben werden bei einem kompetitiven Rezeptorbindungsassay gemäß Oberbegriff von Anspruch 1 wenigstens teilweise durch Radiorezeptorassays gelöst, die die im Kennzeichen des Anspruchs 1 wiedergegebenen Merkmale aufweisen.

35

Im Rahmen der zur Lösung der o.g. Aufgabe führenden Unter-

suchungen wurden ferner verschiedene überraschende neue Erkenntnisse gewonnen, die die Bindung von TSH, insbesondere bTSH, an rhTSHR betreffen und als Beiträge zur Lösung der o.g. Aufgabe bzw. bevorzugte Ausführungsformen Teil der vorliegenden Gesamterfindung geworden sind, wie sie den nebengeordneten und nachgeordneten Ansprüchen des Anspruchssatzes dieser Anmeldung zu entnehmen ist.

Derartige vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen verbesserten Rezeptorbindungsassays sind den Unteransprüchen zu entnehmen, insbesondere in Verbindung mit den detaillierteren Erläuterungen in der nachfolgenden Beschreibung, denen der Fachmann auch entnehmen kann, daß verschiedene der neuen Erkenntnisse von genereller Bedeutung sind und nicht nur im Rahmen der in der vorliegenden Anmeldung geschilderten speziellen Assay-Varianten genutzt werden können.

Die Aufgabe der Schaffung eines Reagenziensatzes zur Verwirklichung der vorliegenden Erfindung wird durch einen bevorzugten Reagenziensatz gelöst, der wenigstens jeweils einen der Bestandteile (i) und (ii) gemäß Anspruch 15 enthält.

In der Einleitung und im nachfolgenden Teil dieser Anmeldung werden die verwendeten Reagenzien bzw. Analyten/Biomoleküle in der Regel mit verschiedenen Abkürzungen gekennzeichnet, die stets in den folgenden Bedeutungen zu verstehen sind, es sei denn, es ergibt sich aus dem konkreten Zusammenhang für den Fachmann ausnahmsweise etwas anderes. Die Verwendung der speziellen Angaben erfolgt dabei aus Gründen der exakten Beschreibung der durchgeführten Versuche und Messungen, bedeutet jedoch nicht, daß die beschriebenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen nur für den beschriebenen Spezialfall gelten. Zahlreiche der vermittelten Informationen sind vielmehr für den Fachmann in ihrer allgemeineren Bedeutung klar erkennbar.

Erläuterungen zu den verwendeten Abkürzungen:

TSH = Thyroidstimulierendes Hormon (Thyreotropin). Wird die Abkürzung TSH ohne weitere Zusätze verwendet, handelt es sich nicht um ein bestimmtes Produkt, sondern die Bindung bzw. Funktion des Hormons wird in allgemeiner Form diskutiert.

bTSH = Bovines (d.h. aus Rindern gewonnenes) TSH. Präparat, das in Assays zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor als Tracer eingesetzt wird (insbesondere radioiodiert oder, wie hierin beschrieben, mit einem Chemilumineszenzlabel, insbesondere einem Acridiniumesterlabel, markiert; es liegt jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, irgendein bekanntes anderes Label zu verwenden).

^{125}I -bTSH = Radioiodiertes, als Kompetitor eingesetztes bTSH. Im Zusammenhang mit der Beschreibung von Assays der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH steht ^{125}I -bTSH insbesondere für ein Produkt, wie es gemäß DE 42 37 430 C1 bzw. EP 0 668 775 B1 erhalten wird und Bestandteil des TRAK-Assay® der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH ist.

hTSH = Humanes TSH. Kommt im Serum/Plasma Gesunder nur in sehr geringen Konzentrationen 0,2-4 mU/l vor. In Seren von hypothyreoten Patienten kann die hTSH-Konzentration jedoch signifikant erhöht sein. Die durch erhöhte hTSH-Spiegel (von mehr als 20 mU/l) hervorgerufenen Störungen von Autoantikörper-Messungen werden in der Beschreibung diskutiert und durch spezielle Maßnahmen neutralisiert. Der gegenwärtige Kenntnisstand zur Struktur von hTSH findet sich zusammengefaßt in Grossmann et al., Endocrine Reviews, Vol.18, 1997, S. 476-501.

TSHR = Der TSH-Rezeptor, ein in der Schilddrüsenmembran verankerter Glykoproteinrezeptor. Wird die Abkürzung TSHR ohne weitere Zusätze verwendet, handelt es sich nicht um ein bestimmtes Produkt, sondern die Funktion des Rezeptors bzw. seine Bindungsbeteiligung wird in allgemeiner Form diskutiert.

porc.TSHR = Aus Schilddrüsen von Schweinen (porcines) extraktiv gewonnenes solubilisiertes crudes Rezeptorpräparat. Wird in den Radiorezeptor-Präzipitationsassays des Standes der Technik zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen den TSHR (herkömmlicher TRAK-Assay® der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH) als spezifischer Binder eingesetzt.

rhTSHR = Gentechnisch erzeugtes (rekombinantes) Polypeptid, das die Aminosäuresequenz eines natürlich vorkommenden humanen TSHR wenigstens in einem solchen Ausmaße aufweist, daß es als "funktionaler humaner TSH-Rezeptor" bezeichnet werden kann, was bedeutet, daß es sich bezüglich der Bindung von Autoantikörpern gegen den TSHR bzw. von hTSH in signifikantem Ausmaß wie der natürlich vorkommende humane TSHR verhält. Wird die Abkürzung rhTSHR ohne weitere Zusätze verwendet, handelt es sich nicht um ein bestimmtes Produkt, d.h. rhTSHR kann für irgendein rekombinantes vollständiges, mehr oder weniger glykosyliertes Polypeptid, eine Teilsequenz einer ausreichenden Länge oder ein gentechnologisch erzeugtes Fusionsprodukt davon stehen (wie es z.B. in der Internationalen Patentanmeldung PCT/EP97/06121 beschrieben wird). Ohne weitere Erläuterungen liegt ein einfach als "rhTSHR" bezeichnetes Produkt als crude deter-

genssolubilisierete Membranpräparation vor, d.h. in der Form, wie sie durch konventionelle Solubilisierung von Membranen der zur Expression des rekombinanten Polypeptids verwendeten Zellen unter Verwendung von Detergenzien erhalten wird.

rhTSHR(imm) = Selektiv an eine Festphase gebundenes (immobilisiertes) rhTSHR-Präparat. Die Bindung kann - wie in der Beschreibung nachfolgend genauer beschrieben - über einen geeigneten Antikörper erfolgen, kann aber im Falle von Fusionsprodukten auch über einen besonderen Peptidrest, z.B. einen Biotinrest, erfolgen. Die Festphase kann die Wand eines Teströhrchens (Coated-Tube- oder CT-Technik) sein, kann aber auch eine geeignete suspendierte Festphase sein.

rhTSHR(imm)* = Über einen ausgewählten Anti-hTSHR-mAb an eine Festphase (s.o.) gebundener und in gebundener Form durch Waschen von Fremdbestandteilen gereinigter immobilisierter rhTSHR. Wird auch als "affinitätsgereinigter rhTSHR" bezeichnet.

Ab = Antikörper

TSHR-Auto-Ab = In biologischen Proben, insbesondere humanem Serum oder Plasma, nachweisbare Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor. Der Nachweis stimulierender derartiger TSHR-Auto-Ab (in der Literatur auch abgekürzt TSI = thyroid stimulating immunoglobulins) ist insbesondere für die Diagnose des Morbus Basedow (englisch: Graves' disease) von Bedeutung. Ein kommerzieller Assay (Radiorezeptorassay) zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab ist der TRAK-Assay® der Fa.

B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH.

Anti-hTSHR-mAb = Monoklonaler Antikörper, der an rhTSHR bindet. Ohne weitere Erläuterungen kann er, was sein Bindungsverhalten angeht, sequentieller Natur sein, wie z.B. in der älteren Anmeldung DE 196 51 093.7 beschrieben wird, er kann jedoch auch konformativer Natur sein. Die Selektion bestimmter derartiger Anti-hTSHR-mAb für die Verwirklichung der erfindungsgemäßen Assays wird in der Anmeldung näher beschrieben. Werden in den Versuchen spezielle Anti-hTSHR-mAb verwendet, werden sie durch eine in der Anmeldung erläuterte Kennnummer gekennzeichnet. Wird eine leicht abgewandelte, weniger spezifische Abkürzung (z.B. einfach Anti-TSHR-Ab) verwendet, soll eine an dieser Stelle unnötige Beschränkung auf monoklonale Ab gegen den humanen TSHR vermieden werden.

Anti-bTSH-Ab = In humanen Seren bzw. Plasma vorkommende Antikörper ungeklärten Ursprungs, die mit bTSH unter Bildung von Immunkomplexen reagieren und damit die Bindung von bTSH an die Assaykomponenten bzw. das erhaltene Meßergebnis beeinflussen (vgl. Y.Ochi et al., Acta Endocrinologica (Copenh) 1989, 120: 773-777; S.Sakata et al., J.Endocrinol. Invest. 14: 123-130, 1991; T. Inui, Thyroid, Vol.6: 295-299, 1996).

Wie im einleitenden Teil erläutert wurde, enthalten die bekannten kompetitiven Rezeptorbindungsassays, die alle als Radiorezeptorassays ausgestaltet sind, neben den benötigten Standards und Pufferlösungen folgende grundlegenden Assaybe-

standteile:

(i) Eine TSH-Rezeptor-Präparation als spezifischen Binder, in den herkömmlichen Assays insbesondere einen aus Schweine-Schilddrüsenmembranen gewonnenen solubilisierten nativen porcinen TSH-Rezeptor (porc.TSHR), (ii) ^{125}I -bTSH, das mit TSH-Rezeptor-Autoantikörpern aus einer Serumprobe oder Plasmaprobe (TBII) um gemeinsame Bindungsstellen an dem verwendeten TSH-Rezeptor konkurriert und (iii) ein Mittel zur Abtrennung des gebildeten TSHR-Komplexes von der flüssigen Reaktionslösung, das im Falle des herkömmlichen Assay das Fällungsmittel Polyethylenglykol (PEG) ist.

Es ist ein die vorliegende Erfindung gegenüber dem bekannten Stand der Technik auszeichnendes Merkmal, daß experimentell gezeigt wurde, daß es möglich ist, anstelle einer solubilisierten TSHR-Präparation einen funktionalen rhTSHR (d.h. einen humanen rekombinanten TSH-Rezeptor) in affinitätsgereinigter Form zu verwenden, der selektiv an einer Festphase immobilisiert ist, ohne daß die Bindungsfähigkeit des affinitätsgereinigten rhTSHR (rhTSHR(imm)*) gegen die zu bestimmenden TSHR-Auto-Ab und markiertes bTSH nennenswert beeinträchtigt ist. Mit dieser Erkenntnis wurde die Voraussetzung geschaffen, einen in mehrfacher Hinsicht noch weiter verbesserten Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab zu entwickeln, bei dem die Bestimmung der Menge des gebundenen markierten bTSH direkt in festphasengebundener Form erfolgen kann. Bei der genaueren Untersuchung der Bindung von bTSH an die neuartige TSHR-Präparation wurden zusätzliche wertvolle Erkenntnisse gewonnen, die in die Erfindung bzw. ihre bevorzugten Ausführungsformen Eingang gefunden haben. Nähere Einzelheiten sind dem experimentellen Teil zu entnehmen. Die wichtigsten der genannten weiteren Erkenntnisse sind:

1. Die Bindung von bTSH an TSHR-Präparationen wird durch die Anwesenheit von Heparin in der Reaktionslösung optimiert.

2. Für die Bindung von bTSH an rhTSHR-Präparationen ist die Anwesenheit von bestimmten Serumbestandteilen erforderlich, die als Bestandteile einer Serumfraktion, die nur Substanzen mit Molekulargewichten von <10.000 d enthält, charakterisiert werden konnten. Einige der niedermolekularen Substanzen, die die Bindung ermöglichen, insbesondere gelöste anorganische Ionen, konnten genauer identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, daß anorganische Ionen jedoch bei Komplexbildung durch EDTA, d.h. in festen Komplexen gebunden, die genannte Wirkung nicht aufweisen.

3. Der Störeinfluß von pathologisch hohen hTSH-Konzentrationen in einzelnen Patientenproben läßt sich durch Zusatz von bestimmten kommerziell erhältlichen Antikörpern (Anti-hTSH-Ab) zur probenhaltigen Meßlösung neutralisieren, die selektiv hTSH binden und nicht mit dem als Kompetitor eingesetzten bTSH kreuzreagieren.

4. Wenn man die Bestimmung als "Zweischritt-Bestimmung" durchführt, indem man markiertes bTSH in einem nachgeschalteten Schritt mit einem vorher gebildeten und von der ursprünglichen Meßlösung abgetrennten Komplex aus TSHR-Auto-Ab und dem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* reagieren läßt, kann sich eine mögliche Anwesenheit von Anti-bTSH-Ab in der Patientenprobe nicht mehr störend auswirken.

5. Die oben unter 2. aufgeführte neue Erkenntnis ermöglicht es, die Umsetzung mit bTSH im zweiten Assayschritt mit einem exakt standardisierbaren, von Serum freien bTSH-Reagens durchzuführen.

Dadurch, daß das erfindungsgemäße Verfahren eine Bindung der TSHR-Auto-Ab und des markierten Kompetitors bTSH aus der Meßlösung direkt an einen festphasengebundenen, affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* gestattet, wird nicht nur die Messung des erhaltenen Signals gegenüber einem Präzipitationsassay im gewünschten Sinne praktisch vereinfacht, sondern das Assayde-

sign kann grundsätzlich verändert werden, indem man von einem
Einschritt-Assay (eine einzige, durch aufeinanderfolgende
Pipettierungen ohne zwischenzeitliche Fest-Flüssig-Trennung
erhaltene Meßlösung) zu einem Zweischritt-Assay übergeht, bei
dem man die Umsetzung von rhTSHR(imm)* mit der Probe und die
Umsetzung mit dem markierten Kompetitor bTSH in zwei aufeinander-
erfolgenden, durch eine Fest-Füssig-Trennung voneinander
abgesetzten Schritten durchführt.

Als Festphasenträger für den affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)*
können Kunststoffoberflächen, insbesondere die Wände von
Kunststoff-Teströhrchen für die CT-Technik, Mikropartikel,
Magnetpartikel, Filter, Polymergelmateriale und andere
bekannte Festphasenträger eingesetzt werden. Durch das
erfindungsgemäße Verfahren wird die TSHR-Auto-Ab-Bestimmung
auch automatisierbar. So kann das Assaydesign so angepaßt
werden, daß es an bekannten automatisierten Systemen durchführ-
bar ist (vgl. z.B. Elecsys-System der Firma Boehringer Mannheim
oder ACS 180-System von Ciba Corning). Bei derartigen automati-
sierten Systemen werden im Rahmen einer automatischen Ab-
arbeitung die Proben in rezeptorbeschichtete Teströhrchen
pipettiert, inkubiert, dann wird die flüssige Reaktionsmischung
abgesaugt oder dekantiert, und es wird eine zweite Lösung mit
dem markierten bTSH, z.B. ¹²⁵I-bTSH, zugesetzt. Nach der
vorgeschriebenen Inkubation erfolgt dann die übliche ab-
schließende Fest-Flüssigtrennung, wonach das Signal, gegebenen-
falls nach Signalauslösung durch Zugabe geeigneter Reagenzien,
gemessen werden kann. Die beispielhaft für einen Zweischritt-
Assay angegebene Pipettierschrittfolge ist dabei variabel und
z.B. durch die Pipettierfolge eines Einschritt-Assays (2.1.1),
ggf. auch ohne vorherige Immobilisierung des rTSHR, ersetzbar.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung in ihren ver-
schiedenen Aspekten anhand von konkreten Ausführungsbeispielen
und Versuchsergebnissen unter Bezugnahme auf acht Figuren noch
näher erläutert. Auf die allgemeinen Erläuterungen im Zusammen-
hang mit den beschriebenen Versuchen wird ausdrücklich als Teil

der Offenbarung der vorliegenden Erfindung verwiesen.

Dabei zeigen die Figuren in Form verschiedener Diagramme:

5 Figur 1:

Die Bindung von ^{125}I -bTSH an einen affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* in Abhängigkeit von der Menge an Serum in der Reaktionslösung;

10 Figur 2:

Das HPLC-Elutionsprofil (Kurvenzug -o-) eines Humanserums bei einer SW300-Gelfiltration sowie den Einfluß der einzelnen Serumfraktionen auf die Bindung von ^{125}I -bTSH an einen affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* (Kurvenzug -□-).

15

Figur 3:

Die Bindung von ^{125}I -bTSH an einen affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* in Abhängigkeit von der molaren Menge an CaCl_2 (Kurvenzug -•-) sowie der gleichzeitigen Anwesenheit von EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) in der Meßlösung (Kurvenzug -□-).

20

Figur 4:

Ein Diagramm, das die Bindung von ^{125}I -bTSH an einen affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* in einem HEPES-Puffersystem in Anwesenheit von a) CaCl_2 oder b) Humanserum oder c) ohne einen der unter a) und b) genannten Zusätze in Anwesenheit verschiedener Mengen Heparin (U/l) zeigt.

30 Figur 5:

Die Abhängigkeit der Bindung von ^{125}I -bTSH an einen affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)*, der in einem vorgeschalteten Umsetzungsschritt mit Serum mit steigenden Anteilen hTSH behandelt worden war (Kurvenzug -■-), wobei ein Teil der Seren (Kurvenzug -▲-) zusätzlich einen Überschuß eines selektiven Anti-hTSH-Ab enthielt;

35

Figur 6:

Die Standardkurve für die Messung von TSHR-Auto-Ab unter Verwendung von ^{125}I -bTSH und von einem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* in einem Zweischnitt-Verfahren.

5

Figur 7:

Die Standardkurve für die Messung von TSHR-Auto-Ab unter Verwendung von einem mit einem Akridiniumester chemilumineszenz-markierten bTSH und von einem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* in einem Zweischnitt-Verfahren.

10

Figur 8:

Die Ergebnisse der Messung von Patientenseren (100 Kontrollseren; 70 Seren von Morbus Basedow-Patienten) nach dem Zweischnitt-Verfahren unter Verwendung von ^{125}I -bTSH und affinitätsgereinigtem rhTSHR(imm)*.

15

Die nachfolgenden Beschreibungen von Herstellungs- und Meßexperimenten gliedern sich wie folgt:

20

1. Herstellung/Auswahl der verwendeten Assaykomponenten;
2. Versuche zur Bestimmung verschiedener Einflußgrößen auf die Bindung von bTSH an einen immobilisierten affinitätsgereinigten rekombinanten humanen TSHR (rhTSHR(imm)*), einschließlich der Beschreibung der Inkubationsprotokolle für 2 Meßverfahren unter Verwendung von markiertem bTSH und affinitätsgereinigtem rhTSHR(imm)* nach einer Einschnitt- und Zweischnitt-Technik; und
3. Ergebnisse der Messung von TSHR-Auto-Ab in Standardproben bzw. Patientenseren unter Verwendung von erfindungsgemäßen Teströhrchen, die mit affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* beschichtet sind, nach dem Prinzip der Konkurrenz mit markiertem bTSH.

30

35

1. Materialien

1.1 Herstellung einer Präparation eines kruden solubilisierten rhTSHR

5

Um den rhTSHR in hoher Ausbeute in einer Säugetierzelllinie zu exprimieren, wurde eine humane chronische Leukämiezelllinie analog zu gängigen Arbeitsweisen mit einem bicistronischen Vektor, der die cDNA für den vollständigen humanen TSH-Rezeptor

10 enthielt, stabil transfiziert und in Suspensionskultur

gezüchtet. Orientierende Versuche mit anderen Systemen zeigten, daß das spezielle Expressionssystem nicht kritisch ist und mit im wesentlichen gleichem Erfolg auch mit dem in EP-A-0 719 858 beschriebenen, mit Myelom-Zelllinien arbeitenden Expressionssystem oder mit dem in PCT/EP97/06121 beschriebenen Vacciniavirus/HeLa-Zellen-Expressionssystem gearbeitet werden kann. Auch mit den in EP-B1-0 433 509 beschriebenen Warmblüterzellen konnte der rhTSHR in einer Qualität erhalten werden, die eine Durchführung der Lehre dieser Anmeldung ermöglichte. Aufgrund

15

20

Zellen, die den exprimierten rhTSHR in ihrer Zellmembran enthielten, wurden zur Gewinnung einer solubilisierten rhTSHR-Präparation aufgeschlossen, wie genauer beschrieben wird in S. Costagliola et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 75: 1540-1544

30

35

(1992), wobei alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt wurden. Und zwar wurden jeweils 10⁹ Zellen in 50mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure); pH 7,5 aufgeschlossen. Der Aufschluß erfolgte unter Zuhilfenahme eines Potter-Homogenisators (Fa. B Braun Melsungen AG) durch zehnfaches Auf- und Abbewegen des Kolbens bei einer Drehzahl von 900 U/min. Das erhaltene Material wurde bei 100.000 g 30 min zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 20 ml Puffer

(10 mM HEPES; 2% Triton-X-100; pH 7,5) unter Wiederholung der beschriebenen Arbeitsweise rehomogenisiert und wiederum 30 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand, der die krude solubilisierete rhTSHR-Präparation enthielt, wurde portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

1.2 Herstellung von markiertem bTSH

1.2.1 ¹²⁵I-bTSH

¹²⁵I-bTSH wurde wie in den Patenten DE 42 37 430 C1 bzw. EP 0 668 775 B1 beschrieben, hergestellt.

1.2.2 Mit Akridiniumester chemilumineszenz-markiertes bTSH

Mit Akridiniumester chemilumineszenz-markiertes bTSH wurde wie folgt hergestellt: 100 µg bTSH (50-60 IU/mg Protein; in 20 mM Natriumphosphat; pH 7,0) wurden mit 10 µl Akridiniumester (Fa. Behringwerke AG, Marburg; vgl. EP 0 257 541 B1; 1 mg/ml in Acetonitril) für 15 min bei Raumtemperatur umgesetzt und anschließend mittels HPLC an einer Waters-Protein Pak SW 125-Säule präpariert (Laufmittel: 0,1 M Ammoniumacetat; pH 5,5; Flußrate: 0,6 ml/min). Alle Fraktionen des Säulenausflusses mit einer UV-Absorption bei 280 nm und 368 nm wurden gesammelt. Die gepoolte Proteinfraktion wurde bis zur weiteren Verwendung in Rezeptorbindungsassays bei -80°C gelagert.

1.3 Standards

Standards für die Bestimmung von TSHR-Auto-Ab wurden durch Mischen von TSHR-Auto-Ab-positiven Seren mit bekanntem Antikörpergehalt und Autoantikörper-freien Humanseren hergestellt, jeweils auf 0,05% Natriumazid eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Kalibrierung der Standards erfolgte am TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH.

1.4 Anti-hTSHR-mAb-Gewinnung und Selektion

Es wurde ein Kollektiv monoklonaler Maus-Antikörper gegen den TSH-Rezeptor unter Anwendung verschiedener Immunisierungsmethoden wie in der Literatur beschrieben, hergestellt (J.S. Dallas et al., Endocrinology 134, No. 3, S. 1437-1445 (1994) - Immunisierung mit nach dem Baculovirus-Verfahren rekombinant hergestellter extrazellulärer Rezeptordomäne; L.B. Nicholson et al., J. Mol. Endocrinol. (1996) 16, S. 159-190 - Immunisierung mit der in Prokaryonten-Zellen oder nach dem Baculovirus-Verfahren erzeugten extrazellulären Rezeptordomäne; Johnstone A.P. et al., Mol. Cell. Endocrinol. 105 (1994), R1-R9; - Immunisierung mit verschiedenen rekombinanten TSHR-Polypeptiden; Immunisierung mit synthetischen Rezeptorpeptid-Konjugaten; J. Sanders et al., J. Endocrinol. Invest. 19 (Suppl. to No. 6): 1996, Abstract 33 - Immunisieren mit in E.Coli erzeugten, TSHR-Fragmente enthaltenden Fusionsproteinen; sowie insbesondere S. Costagliola und G. Vassart, J. Endocrinol. Invest. 20 (Suppl. to No. 5): 1997, Abstract No. 4 - Immunisierung von Mäusen mit einem DNA-Konstrukt).

Die Selektion sowie Gewinnung einzelner Klone erfolgte wie in den jeweiligen zitierten Literaturstellen beschrieben bzw. nach allgemein bekannten Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Die Reinigung der verschiedenen erhaltenen monoklonalen Antikörper erfolgte mittels Protein A-Affinitätschromatographie. Elf der erhaltenen Anti-hTSHR-mAb wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, einen vorher erzeugten Komplex aus rhTSHR und ¹²⁵I-bTSH zu binden.

Dazu wurde in einem ersten Schritt ¹²⁵I-bTSH (36.000 cpm Totalaktivität) mit dem solubilisierten rhTSHR (ca. 1 ng) in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert, das 50 mM HEPES; pH 7,5; 10.000 IU/ml Heparin; 10 mM CaCl₂; 0,2% Triton X-100 enthielt (vgl. die nachfolgenden Versuchsergebnisse). Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung wurde in separaten Ansätzen je 0,1 IU/ml unmarkiertes bTSH zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation

bei Raumtemperatur erfolgte die Bestimmung der Bindung bTSH/rhTSHR nach drei unterschiedlichen Methoden:

1.4.1 Isolierung von vorher gebildeten bTSH/rhTSHR-Komplexen mittels PEG-Präzipitation (Gewinnung eines Bezugswerts)

Der obigen Reaktionslösung wurden 2 ml PEG-Fällungsreagenz aus dem TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH zugesetzt. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min bei 2.000 g), der Überstand wurde dekantiert, und es wurde die im Sediment verbliebene Radioaktivität gemessen. Es wurde eine quantitative Fällung des gebildeten bTSH/rhTSHR-Komplexes festgestellt.

1.4.2 Immunpräzipitation von vorher gebildeten bTSH/rhTSHR-Komplexen mit den zu prüfenden Anti-hTSHR-mAb

Zu der obigen Reaktionslösung wurden jeweils 10 µg (in 50 µl des zur Erzeugung des bTSH/rhTSHR-Komplexes verwendeten Puffers) des jeweiligen zu untersuchenden Anti-hTSHR-mAb zugesetzt, und nach einer einstündigen Inkubation wurden als Fällungsreagenz 100 µl Protein A (aus HENNING-Test® anti-TPO der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH) zugegeben, 15 min inkubiert und schließlich 2 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) zugegeben, wonach zentrifugiert wurde (15 min bei 2.000 g). Durch die Zugabe von Protein A werden alle in der Reaktionsmischung enthaltenen Antikörper ausgefällt. Der bTSH/rhTSHR-Komplex wird nur insoweit ausgefällt, als er an den zu untersuchenden Antikörper gebunden hat. Demzufolge repräsentiert die im Zentrifugationssegment zu findende Radioaktivität die Menge an bTSH/rhTSHR-Komplex, die von dem jeweiligen Anti-hTSHR-mAb gebunden wurde.

1.4.3 Bindung von vorher gebildeten bTSH/rhTSHR-Komplexen mit Hilfe immobilisierter Anti-hTSHR-mAb (CT-Technik)

Zur Immobilisierung der jeweiligen Anti-hTSHR-mAbs wurden mit Ziegen-anti-Maus-Antikörper beschichtete Polystyrolröhrchen

(Kit-Bestandteil des DYNtest® TBG der Firma B.R.A.H.M.S. Diagnostica GmbH) mit je 100 ng der zu untersuchenden Anti-hTSHR-mAb mit den Kennnummern 1 bis 11 in 200 µl PBS 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PBS zugegeben, und der flüssige Röhrcheninhalt wurde dekantiert. Die erhaltenen beschichteten Teströhrchen wurden dann direkt mit der oben beschriebenen Reaktionslösung inkubiert, die den bTSH/rhTSHR-Komplex enthielt (100 µl), und zwar 1 h unter Schütteln bei 300 U/min. Danach wurden die Teströhrchen zweimal mit je 2ml Waschpuffer (10 mM HEPES; 0,1 Triton X-100; pH 7,5) gewaschen, und die auf der Oberfläche der Teströhrchen fixierte Radioaktivität wurde gemessen. Als vollständige Bindung des bTSH/rhTSHR-Komplexes wird der bei der PEG-Fällung erhaltene Radioaktivitätswert eingesetzt, abzüglich der getrennt ermittelten unspezifischen Bindung: $(B-UB) = 10.490 - 433 \text{ cpm} = 10.057 \text{ cpm}$. Dieser Wert entspricht einem B/T-Wert (gebundene Radioaktivität zu eingesetzter Gesamtradioaktivität) von 28 %.

Die bei der Prüfung der Anti-hTSHR-mAb 1-11 erhaltenen Bindungswerte nach den Verfahren 1.4.3 und 1.4.4 werden in der nachfolgenden Tabelle Nr. 1 angegeben, wobei die Radioaktivität des Sediments der PEG-Fällung gemäß 1.4.1 als Bezugswert mit 100% angesetzt wurde. Bei allen gezeigten Daten sind die unspezifischen Bindungen, d.h. die Radioaktivität in Anwesenheit eines Überschusses an unmarkiertem bTSH, abgezogen.

Tabelle 1

Anti- körper- Nummer	Immunpräzi- pitation mit 10 µg Ab % Bindung	CT-Assay mit 100 ng Ab % Bindung	Reaktivi- tät im Western- blot	Epitop
	*	*	**	***
1	40,9	4	+	22-35
2	11	< 2	+	32-54
3	12,8	< 2	+	287-301
4	10,8	< 2	+	334-343
5	28	5,1	+	354-359
6	13,4	3,5	+	352-361
7	41,7	8	+	361-381
8	< 2	< 2	+	402-415
9	99	47,6	-	3D
10	103	16,2	-	3D
11	104	20,6	-	3D

Erläuterungen zu Tabelle 1:

* Die Werte sind jeweils angegeben als prozentuale Fällung des maximal fällbaren bTSH/rhTSHR-Komplexes (100% = Präzitation bei PEG-Fällung);

** bestimmt wie beschrieben von Johnstone, A. P. et al., Mol. Cell. Endocrinol. 105 (1994), R1-R9;

*** vgl. die nachfolgenden Versuche zur Kartierung der Bindungsstellen von Anti-hTSHR-mAb (Maus)

1.4.4. Kartierung der Bindungsstellen von Anti-hTSHR-mAb (Maus)

Das Prinzip der Kartierung beruht darauf, daß festgestellt wird, an welche synthetischen Teilpeptidsequenzen des hTSHR der

jeweilige zu untersuchende Antikörper bindet.

1.4.4.1 Herstellung eines Kollektivs von Peptiden, die Teilsequenzen des hTSHR entsprechen.

5

Es wurden jeweils 13 Aminosäuren umfassende Teilsequenzen der hTSHR-Sequenz in Form synthetischer Peptide hergestellt. Die Teilsequenzen wurden dabei so gewählt, daß die gesamte hTSHR-Sequenz abgebildet wird und je zwei aufeinanderfolgende Sequenzen um neun Aminosäuren überlappen (z.B. Peptid 1: Aminosäuren 1 bis 13; Peptid 2: Aminosäuren 4 bis 16; Peptid 3: Aminosäuren 7 bis 19 usw.). Die synthetischen Peptide wurden dann nebeneinander in Form von ca. 2 x 2 mm großen "Spots" auf Zellulosepapier synthetisiert. Dieses Verfahren der Peptidherstellung ist ein etabliertes Verfahren und wird kommerziell u.a. von der Firma JERINI Biotools GmbH, Berlin, angeboten. Zur Erläuterung wird verwiesen auf die folgenden Literaturstellen: R. Frank, Peptides 1990, 151-152; A. Furga et al., Int. J. Peptide Protein Res. 37, 1991, 487-493; R. Frank, Tetrahedron Vol. 48, Nr. 42, 9217-9232, 1992. Das Papier mit den Peptidspots wurde 1 h bei Raumtemperatur in 20 ml sogenannter "Blockierungslösung" inkubiert (Blockierungslösung: 50 mM Tris; pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,05% Tween 20; 5% Saccharose; 1 x Blocking Reagent der Firma Cambridge Research Biochemicals, Nr. SU-07-250).

1.4.4.2 Charakterisierung der Anti-hTSHR-mAb 1 bis 11

Dem gemäß 1.4.4.1 präparierten Zellulosepapier wurden dann 20 µl einer Lösung zugesetzt, die einen der zu untersuchenden Anti-hTSHR-mAb 1-11 in einer Konzentration von 10 µg/ml enthielt. Anschließend wurde 3h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert, danach dekantiert. Das Papier wurde 6 x mit 5 ml "Waschpuffer" gewaschen (Waschpuffer: 50 mM Tris; pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,05% Tween). Dann wurden 20 ml der obigen Blockierungslösung zugegeben, die 5µl Ziege-anti-Maus-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat der Firma BIORAD, Nr. 172-1015

in frisch verdünntem Zustand enthielt. Es wurde wiederum 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Dann wurde wiederum dekantiert, und das Papier wurde 6 x mit 5 ml des obigen Waschpuffers gewaschen.

5

Durch Zugabe einer Substratlösung, die mit der Antikörper- gebundenen alkalischen Phosphatase reagiert, wurden schließlich diejenigen Peptide identifiziert, an die der jeweilige unter- suchte Anti-hTSHR-mAb gebunden hatte. Die zur Sichtbarmachung verwendete Substratlösung wurde wie folgt erhalten: 6 mg Nitro Blue Tetrazolium (SIGMA Nr. N-6876) wurden in 6 ml Dimethyl- formamid gelöst. 2,5 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (SIGMA-Nr. B-8503) wurden in 0,5 ml Dimethylformamid gelöst. 4 ml der beschriebenen Nitro Blue Tetrazolium-Lösung, 400 µl der 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphatlösung sowie 160 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung wurden in 36 ml Substratlösung aus dem ELitest® Anti-TG der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH, Nr. 944638, gelöst. Die erhaltene Lösung wurde auf das Zellulosepa- pier gegeben.

10

15

20

Nach 20 min bei Raumtemperatur waren diejenigen Peptidspots, an die der untersuchte Anti-hTSHR-mAb gebunden hatte, aufgrund der Substratreaktion violett angefärbt. Die den angefärbten Spots entsprechenden Peptide wurden auf diese Weise als Bindungsstellen des untersuchten Anti-hTSHR-mAb identifiziert. Die auf diese Weise ermittelten Bindungsstellen der unter- suchten Anti-hTSHR-mAb sind in der letzten Spalte der obigen Tabelle 1 aufgeführt. Die Anti-hTSHR-mAb mit den Nummern 9, 10 und 11 banden an keines der vorgelegten Peptide, was als Hinweis darauf anzusehen ist, daß diese Antikörper 9, 10 und 11 solche sind, die ausschließlich konformationelle Strukturen des rhTSHR erkennen. Die genannten "konformationellen" Anti- hTSHR-mAbs 9, 10 und 11 waren dabei nach dem Verfahren von S. Costagliola und G. Vassart gemäß Veröffentlichung in J. Endocrinol. Invest. 20 (Suppl. 2, No. 5) 1997, Abstract 4 durch Immunisierung von Mäusen mit einem hTSHR-DNA-Konstrukt erhalten worden.

30

35

Bei den oben unter 1.4.3 beschriebenen Versuchen zur Bindung des bTSH/rhTSHR-Komplexes mit den verschiedenen Anti-hTSHR-mAb hatte sich gezeigt, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, daß die meisten Antikörper, obwohl in einem erheblichen Überschuß eingesetzt (10 µg Antikörper gegenüber ca. 1 ng rhTSHR!), nicht in der Lage waren, den bTSH/rhTSHR-Komplex vollständig zu präzipitieren. Lediglich die Antikörper 9, 10 und 11 ermöglichten eine vollständige Fällung des genannten bTSH/rhTSHR-Komplexes, und diese erwiesen sich bei der Kartierung als "konformationelle" Antikörper, d.h. solche, die keine bestimmten Peptidesequenzen erkennen, sondern ausschließlich konformationelle Strukturen. Für die Entwicklung eines erfindungsgemäßen Coated-Tube-Assays, bei dem TSHR-Auto-Ab mit Hilfe eines immobilisierten rhTSHR bestimmt werden sollen, wurden daher vorzugsweise die genannten konformationellen Antikörper 9, 10 und 11, die die höchste Bindung lieferten, berücksichtigt.

Es ist jedoch zu betonen, daß die genannten konformationellen Antikörper sich zwar ganz besonders gut zur Immobilisierung von rhTSHR eigneten, daß jedoch auch die restlichen Anti-hTSHR-mAb 1-8 funktionierten, wobei jedoch sehr niedrige Bindungsniveaus erhalten wurden. Derartige monoklonale Antikörper können allein oder gegebenenfalls auch in Form eines Gemischs von zwei oder mehr Anti-hTSHR-mAb zur Bindung von rhTSHR unter Präsentation unterschiedlicher hTSHR-Epitope eingesetzt werden, um im Sinne der Offenbarung in der Patentanmeldung 196 51 093.7 gegebenenfalls zusätzliche Autoantikörper-Subpopulationen im Test zu erfassen und dadurch gegebenenfalls die klinische Wertigkeit zu erhöhen, wenn das sich als erstrebenswert erweisen sollte.

1.5 Immobilisieren und Affinitätsreinigen des rhTSHR unter Gewinnung von Teströhrchen für einen Coated-Tube-Assay zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab

Eine krude solubilisierte rhTSHR-Präparation gemäß 1.1 wurde mit 100 mM HEPES; 0,5% Triton X-100; 0,5% Rinderserumalbumin (BSA); pH 7,5% verdünnt, bis unter Verwendung der Reagenzien

des kommerziellen TRAK-Assays® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH bei der gemäß der Arbeitsvorschrift des genannten Assays durchgeführten PEG-Fällung eine etwa 30%ige Bindung des ¹²⁵I-bTSH erhalten wurde.

5

Zur Herstellung von beschichteten Röhrchen wurden 200 µl der erhaltenen rhTSHR-Verdünnung mit 100 ng des obigen Anti-hTSHR-mAb Nr. 9 versetzt, und die erhaltene Lösung wurde in Polystyrolröhrchen, deren Wände mit Ziege-anti-Maus-Antikörpern (Maus-IgG-Bindekapazität ca. 100 ng) beschichtet waren, gegeben und bei 4°C 20 h inkubiert.

10

Die verwendeten Teströhrchen sind solche, wie sie Bestandteil des Kits DYNOTest® TBG der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH sind.

15

Nach der Inkubation wurden die Röhrchen mit 2 ml Waschpuffer (10 mM HEPES; 0,1% Triton X-100; pH 7,5) gefüllt, dekantiert und danach in einem Vakuumtrockner für 4 h getrocknet. Durch den Waschschrift wurden unerwünschte Begleitsubstanzen entfernt, so daß die Röhrchen auf ihren Wänden einen hoch affinitätsgereinigten rhTSHR (rhTSHR(imm)*) aufwiesen. Die Röhrchen wurden in die nachfolgend beschriebenen Bestimmungen eingesetzt. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie bei 4°C gelagert.

20

2. Versuche zum Bindungsverhalten von bTSH an rhTSHR-Präparationen

30

2.1 Pipettier- und Inkubations-Protokolle

Um das Bindungsverhalten von bTSH an das neuartige affinitätsgereinigte rhTSHR-Rezeptorpräparat (rhTSHR(imm)*) genauer zu untersuchen, wurden unter Verwendung der wie oben unter 1.5 beschrieben erhaltenen Teströhrchen mit dem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* verschiedene Kontrollversuche durchgeführt, wobei eines der folgenden Pipettier-/Inkubations-Protokolle zur

35

Anwendung kam:

2.1.1 Einschritt-Assay

- 5 1. Pipettiere die Probe (Patientenserum, Standardserum oder Nullstandardserum; 100 μ l) in rhTSHR(imm)* beschichtetes Teströhrchen.
- 10 2. Pipettiere dazu 125 I-bTSH bzw. Akridiniumester-markiertes bTSH, jeweils in 100 μ l 100 mM HEPES; 20 mM EDTA; 0,5 mM N-Ethylmaleinimid (NEM); 0,1 mM Leupeptin; 1% BSA; 0,5% Triton X-100; 5 μ g Anti-hTSH-Ab (vgl.3.2); pH 7,5).
- 15 3. Inkubiere 2 h unter Schütteln (300 U/min) bei Raumtemperatur.
4. Wasche zweimal mit je 2 ml Waschpuffer, dekantiere.
- 20 5. Messe die an der Wand des Teströhrchens fixierte Radioaktivität in einem γ -Counter bzw. löse die Lumineszenzreaktion aus und messe die Chemilumineszenz-Lichtausbeute mit einem geeigneten Luminometer, z.B. Berthold LB 952.

2.1.2 Zweischnitt-Assay

- 30 1. Pipettiere in ein rhTSHR(imm)*-beschichtetes Teströhrchen Puffer (200 μ l; 100 mM HEPES; 20 mM EDTA; 0,5 mM NEM; 0,1 mM Leupeptin; 1% BSA; 0,5% Triton X-100; 5 μ g Anti-hTSH-Ab; pH 7,5).
2. Pipettiere die Probe (Patientenserum, Standardserum oder Nullstandardserum; 100 μ l).

3. Inkubiere 2 h unter Schütteln (300 U/min) bei Raumtemperatur.

5 4. Pipettiere 2 ml Waschpuffer (vgl. oben), dekantiere.

5. Pipettiere 200 μ l einer markiertes bTSH (125 I-bTSH oder Akridiniumester-markiertes bTSH) enthaltenden Pufferlösung (10 mM HEPES; 10.000 IU/ml Heparin; 10 mM Calciumchlorid; 1% BSA; 0,1% Triton X-100; pH 7,5).

10

6. Inkubiere 1 h unter Schütteln (300 U/min) bei Raumtemperatur.

15

7. Wasche die Röhrchen bei Verwendung von 125 I-bTSH zweimal mit 2 ml Waschpuffer bzw. bei Verwendung des Akridiniumester-markierten bTSH viermal mit 1 ml Waschpuffer.

20

8. Messe die an der Wand des Teströhrchens fixierte Radioaktivität in einem γ -Counter bzw. löse die Lumineszenzreaktion aus und messe die Chemilumineszenz-Lichtausbeute mit einem geeigneten Luminometer, z.B. Berthold LB 952.

2.2 Untersuchung der Bindung von bTSH an rhTSHR(imm)*

30

Es zeigte sich überraschenderweise, daß 125 I-bTSH an die mit dem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* beschichteten Teströhrchenwände nicht bindet, wenn 125 I-bTSH in einer serumfreien Lösung zugegeben wird, wie sie im Einschnitt-Assay unter 2. zur Anwendung kommt.

Wird gleichzeitig Serum (Patientenserum, Standardserum oder Nullstandardserum) zugesetzt, wird jedoch eine ausgeprägte Bindung erhalten.

35

2.2.1 Versuche zur Bindung von bTSH an rhTSHR(imm)* in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Humanserum

Aufgrund der o.g. Beobachtungen wurde der Effekt des Serumzusatzes isoliert geprüft, indem man im obigen Einschnitt-Assay-Protokoll (2.1.1) als Proben steigende Volumina Humanserum, ergänzt auf 100 µl mit 100 mM HEPES, 0,5% Triton X-100; pH 7,5 verwendete. Die Seren waren Autoantikörper-freie Proben von Schilddrüsen-gesunden Menschen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt.

Wie zu erkennen ist, wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Serum die ¹²⁵I-bTSH-Bindung in Abhängigkeit von der Menge des im Probenvolumen vorhandenen Serums erhöht. Es konnte ferner gezeigt werden, daß dieser Effekt nicht auf die beschriebene Trenntechnologie unter Verwendung von rhTSHR(imm)*-beschichteten Teströhrchen beschränkt ist, sondern daß dieser Effekt auch bei anderen Trenntechniken (Verwendung des kruden solubilisierten rhTSHR mit PEG-Fällung gemäß konventionellem TRAK-Assay®-Inkubationsprotokoll) erhalten wird.

Diese überraschende Feststellung führte zu der Hypothese, daß für eine effektive Wechselwirkung zwischen bTSH und rhTSHR mindestens ein weiterer Faktor benötigt wird, der in normalem Humanserum vorhanden ist, dessen Bedeutung bisher jedoch völlig unerkannt geblieben war und dessen Natur unbekannt war.

Es wurden daher Versuche mit dem Ziel durchgeführt, die Natur dieses weiteren Faktors zu klären.

2.2.2 Fraktionierung von Humanseren und Ermittlung von Serumfraktionen, die die bTSH/rhTSHR-Bindung ermöglichen

Ein Autoantikörper-freies Humanserum von Schilddrüsen-gesunden wurde einer HPLC-Gelfiltration an einer Protein Pak SW 300-Säule unterzogen. Der Säulenausfluß wurde fraktioniert, und die Fraktionen wurden anschließend als "Proben" im Einschnitt-Assay-Protokoll (2.1.1) eingesetzt. Als Laufmittel für die HPLC-Gelfiltration wurde 100 mM HEPES, pH 7,5 verwendet. Die

Flußrate betrug 0,5 ml/min, und es wurden Fraktionen à 0,25 ml gesammelt. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde gemäß den Herstellerinstruktionen unter Verwendung des BCA Protein Assay Reagent der Firma PIERCE durchgeführt (vgl. auch Anal. Biochem., 150, 76-85 (1985)). Die Fraktionen wurden als Proben in Mengen von jeweils 100 µl eingesetzt. Die Kalibrierung der verwendeten Trennsäule erfolgte mit Hilfe des BIORAD-Gelfiltrationsstandards (Thyreoglobulin, IgG, Ovalbumin, Myoglobin, Vitamin B₁₂).

Fig. 2 zeigt einerseits das erhaltene Elutionsprofil der Serumbestandteile (Kurvenzug -o-), ausgedrückt als Protein (mg/ml), andererseits, diesem Elutionsprofil überlagert, die bei Verwendung der einzelnen Fraktionen als Proben im Einzschritt-Assay gemessene ¹²⁵I-bTSH-Bindung (Kurvenzug -□-).

Wie Fig. 2 zu entnehmen ist, waren ausschließlich diejenigen Fraktionen, die nach etwa 21 min Retentionszeit eluiert wurden, in der Lage, die Bindung von bTSH an rhTSHR auszulösen. Derartige Fraktionen erwiesen sich als Fraktionen niedermolekularer Natur mit einem Molekulargewicht von ≤ 10.000 g/mol (Ausschlußvolumen der Gelfiltrations-Säule). Dieses Molekulargewicht liegt unterhalb des Molekulargewichts aller sogenannten Plasmaproteine (vgl. die Tabelle Plasmaproteine, Roche Lexikon Medizin, 2. Auflage, S. 1364-1365).

Mit dem Ziel, die Natur des wirksamen Faktors näher aufzuklären, wurden verschiedene bekannte niedermolekulare Serumbestandteile auf ihre Eignung als bindungsauslösende Zusätze untersucht. Es versteht sich dabei von selbst, daß Begriffe wie "Serumbestandteil" oder "Bestandteil einer niedermolekularen Fraktion" nicht bedeuten, daß solche Bestandteile tatsächlich aus Serum gewonnen sein müssen. Ist ihre Natur einmal aufgeklärt, können die entsprechenden Bestandteile von beliebiger Herkunft sein.

2.2.3 Bestimmung des Einflusses von ausgewählten Metallsalzen und anderen niedermolekularen Substanzen auf die Bindung von bTSH an rhTSHR

5 Nach dem obigen Einschnitt-Assay-Protokoll wurden verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet, eine Bindung von bTSH an rhTSHR zu bewirken. Dabei wurden als Proben jeweils 100 μ l der in Tabelle 2 in Spalte "Substanz" genannten niedermolekularen Kandidaten in 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,5 eingesetzt.

10

Tabelle 2

Substanz	Konzentration (mM)	^{125}I -bTSH Bindung (cpm)
CaCl_2	1	2918
MgCl_2	1	2142
MnCl_2	1	1488
CoCl_2	0,002	<50
CuCl_2	1	<50
FeCl_2	1	<50
FeCl_3	1	<50
NiCl_2	1	235
ZnCl_2	1	<50
NH_4 -Acetat	1	<50
SeCl_4	0,1	<50
Lysin	2	<50
Arginin	10	<50
KI	1	<50
Na-Phosphat	1	<50

15

25

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, wird ein deutlicher positiver Effekt bei Verwendung von Calcium-, Magnesium- und Mangan-Salzen erhalten. Die Salze (Chloride) anderer Metalle oder auch Ammoniumsalze waren genauso weitgehend wirkungslos wie einzelne Aminosäuren, Kaliumiodid oder Natriumphosphat. Die beobachtete bindungsvermittelnde Wirkung bestimmter zweiwertiger Metallionen ist bemerkenswert. Es ist davon auszugehen, daß durch die beschriebenen orientierenden Versuche nicht alle im o.g. Sinne wirksamen Substanzen ermittelt werden konnten, sondern daß vermutlich auch noch andere Substanzen, insbesondere andere zweiwertige Metallsalze, gefunden werden können, die im gewünschten Sinne wirksam sind.

Um zu prüfen, ob es von Bedeutung ist, daß die Metallionen in der Meßlösung weitgehend frei vorhanden sind, wurde die Wirkung des Zusatzes des Komplexbildners EDTA geprüft. Wie Fig. 3 zu entnehmen ist, können Metallchelatoren wie EDTA den bindungsvermittelnden Effekt der Metallionen aufheben (Kurvenzug -▲-).

Ergänzend ist darauf hinzuweisen, daß auch andere der geprüften Ionen, z.B. Ammoniumacetat, in unphysiologisch hohen Konzentrationen (100 mM) eine Bindung von bTSH an das rhTSHR-Präparat fördern können.

Die Erkenntnis, daß Substanzen existieren, die eine Bindung von bTSH an hTSHR in Abwesenheit von Serum ermöglichen, ist wichtig für den Einsatz von markiertem bTSH in Abwesenheit von Serum. Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist das insbesondere für den zweiten Schritt des obigen Zweischritt-Assay-Protokolls (2.1.2) von Bedeutung (vgl. den Zusatz von 10 mM Calciumchlorid in der Lösung des markierten bTSH). Grundsätzlich ermöglicht diese Erkenntnis auch die Schaffung anderer serumfreier Rezeptorbindungs-Assays, z.B. die Bestimmung in isolierten IgG-Fractionen oder gegebenenfalls anderen, normalerweise serumfreien biologischen Flüssigkeiten. Die geschilderten Ergebnisse sind auch von hohem wissenschaftlichen Interesse. Beispielsweise ist denkbar, daß TSH erst durch die Anwesenheit

der geschilderten Faktoren in eine Form überführt wird, die von dem TSHR erkannt werden kann. Dabei ist auch die nachfolgende weitere Beobachtung von Bedeutung.

5 2.2.4 Einfluß sulfatierter Polysaccharide wie Heparin auf die
 Bindung von bTSH an rhTSHR

Bei der Messung von Patientenproben nach dem obigen Einschritt-
Assay-Protokoll (2.1.1) unter Verwendung von ^{125}I -bTSH wurde die
10 überraschende Feststellung gemacht, daß die ^{125}I -bTSH-Bindung
von Proben in Form eines heparinisierten Plasmas (Plasma unter-
scheidet sich von Serum durch die zusätzliche Anwesenheit der
Gerinnungsfaktoren, die durch Heparinzusatz inaktiviert werden)
deutlich höher war als die entsprechenden Serumproben. Es wurde
15 überprüft, ob die Erhöhung der ^{125}I -bTSH-Bindung auf die
Anwesenheit von Heparin in der Meßlösung zurückgeführt werden
kann.

Zu diesem Zwecke wurden im Einschritt-Assay Messungen der
20 Bindung von ^{125}I -bTSH an rhTSHR(imm)* in drei unterschiedlichen
Lösungen, die a) CaCl_2 in HEPES, b) Humanserum in HEPES und c)
ausschließlich HEPES enthielten, durchgeführt, denen steigende
Mengen an Heparin zugesetzt wurden. Wie Fig. 4 zu entnehmen
ist, führt der Zusatz von gereinigtem Heparin zu einer
deutlichen Erhöhung der Bindungsfähigkeit von ^{125}I -bTSH an die
rhTSHR-Präparation. Dabei ist allerdings Heparin allein nicht
in der Lage, die bTSH/rhTSHR-Bindung auszulösen. In Gegenwart
der o.g. Faktoren wie zweiwertige Metallionen, Serum bzw. auch
einer niedermolekularen Serumfraktion oder darin vorkommenden
30 niedermolekularen Bestandteilen erhöht der Heparinzusatz jedoch
die bTSH-Bindung bis auf einen Maximalwert, der durch weiteren
Heparinzusatz nicht mehr verbessert werden kann. Heparin-
ähnliche Substanzen (sulfatgruppenhaltigen Polysaccharide) wie
beispielsweise Dextransulfat verhalten sich ähnlich wie
35 Heparin.

Durch Heparinzusatz zu der Meßlösung läßt sich somit die

spezifische Bindung von TSH an TSHR, gezeigt am Fall der Bindung von bTSH an rhTSHR, deutlich erhöhen. Diese Erkenntnis erwies sich auch auf Assays unter Verwendung anderer TSHR-Präparate als Binder nutzbringend anwendbar, z.B. bei der Verwendung von porc.TSHR im herkömmlichen Assayprotokoll.

Wie im Falle der bindungsvermittelnden Wirkung von niedermolekularen Serumfraktionen bzw. zweiwertigen Metallionen ist auch der Einfluß der Anwesenheit von Heparin von erheblichem wissenschaftlichem Interesse. Eine einfache Interpretationsmöglichkeit besteht nicht. Auf die einschlägige Spezialliteratur zur Natur von TSH bzw. zur vielfältigen Wirkung von Heparin, insbesondere was die durch Heparin verstärkte Bindung zwischen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) und den zugehörigen Rezeptoren angeht, wird hierin nur pauschal verwiesen (vgl. z.B. Grossmann et al., Endocrine Reviews, Vol.18, 1997, S. 476-501; S. Faham et al., Science, Vol. 271, S.1116-1120 (1996); W H Burgess et al., Ann. Rev. Biochem. 1989, 58:575-606 (1989); C Basilico et al., Advances in Cancer Research, Vol. 59, 1992, S. 115-165; J Folkman et al., J.Biol.Chem. 267, 10931-10934 (1992)).

3. Bestimmung von TSHR-Auto-Ab in Patientenseren

3.1 Zweischnitt-Assay zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab und seine Vorteile

Die obigen Erkenntnisse ermöglichen es, die TSHR-Auto-Ab-Bestimmung unter Verwendung von rhTSHR(imm)*-beschichteten Teströhrchen als Zweischnitt-Assay durchzuführen, bei dem im zweiten Schritt ein serumfreies und daher gut standardisierbares markiertes bTSH-Präparat eingesetzt wird. Der Einsatz von markiertem bTSH in einem zweiten Assay-Schritt in Abwesenheit aller nicht an den immobilisierten rhTSHR gebundenen Probenbestandteile schließt sicher eine Meßwertverfälschung durch Anti-bTSH-Ab aus, die in signifikantem Ausmaße in verschiedenen Patientenseren vorkommen (vgl. obige Erläuterung

zu Anti-bTSH-Ab).

Derartige Anti-bTSH-Ab in Patientenseren führen gemäß dem herkömmlichen Assay-Protokoll zu "falsch" erniedrigten Meßwerten für die TSHR-auto-Ab-Konzentration, da derartige Antikörper zusammen mit dem gebundenen markierten bTSH bei der PEG-Fällung mit ausgefällt werden und eine zu niedrige Bindung von TSHR-Auto-Ab vortäuschen.

Bei der Messung nach dem o.g. Einschritt-Assay-Protokoll führt die Anwesenheit von Anti-bTSH-Ab zu "falsch" erhöhten Meßwerten, da zuwenig markiertes bTSH an die Wände des Teströhrchens gebunden wird.

Im Zweischnitt-Verfahren kommt es zu keinem Kontakt zwischen der Probe und dem markierten bTSH, so daß Anti-bTSH-Ab keinen Störfaktor mehr darstellen, und zwar insbesondere dann, wenn im zweiten Schritt serumfrei gearbeitet wird. Derzeit wird daher die Zweischnitt-Variante für die Durchführung von TSHR-Auto-Ab bevorzugt.

3.2 Verhinderung einer Meßverfälschung durch pathologisch erhöhte hTSH-Konzentrationen in Patientenseren.

Aufgrund der Verwendung eines humanen TSHR-Präparats als Rezeptorbinder war zu prüfen, ob die Ergebnisse der Bestimmungen von TSHR-Auto-Ab unter Verwendung der o.g. beschichteten Teströhrchen durch die Anwesenheit von hTSH in Patientenproben gestört werden kann. hTSH kommt normalerweise in Humansenen in außerordentlich geringen, nicht störenden Konzentrationen vor. Es ist jedoch bekannt, daß im hypothyreoten Zustand pathologisch erhöhte hTSH-Konzentrationen vorkommen können.

Ein von hTSH befreites Serum (Skandibodies, USA) wurde zur Gewinnung definierter Probenlösungen mit steigenden Mengen an hTSH (Boehringer Mannheim, Deutschland) versetzt. Die erhaltenen Seren wurden als Proben nach dem obigen Zweischnitt-Assay-

Protokoll (2.1.2) vermessen.

Wie Abbildung 5 zeigt, kommt es bei pathologisch hohen hTSH-Konzentrationen zu einer Beeinflussung der Bindung des markierten bTSH durch Konkurrenz mit dem hTSH.

Indem man der Probenlösung einen hTSH-Antikörper zusetzt, wird der Einfluß der Anwesenheit von hTSH in der Probe aufgehoben. Ein geeigneter hTSH-Antikörper ist der kommerziell erhältliche Antikörper mit der Artikel-Nr. 5404 der Firma Oy Medix Biochemica Ab, Finnland. Durch Zusatz eines Überschusses eines derartigen Antikörpers (z.B. 5 µg/Test) wird der Einfluß von erhöhten hTSH-Konzentrationen beseitigt. Da der genannte hTSH-Antikörper keine Kreuzreaktion mit bTSH zeigt, kann er der Probenlösung auch bei der Einschnitt-Assay-Variante (vgl. 2.1.1, Schritt 2.) zugesetzt werden und führt zur gleichen Verbesserung der Meßergebnisse.

3.3 Verbesserter Assay zur TSHR-Auto-Ab Bestimmung und seine Prüfung in der Praxis

Unter Berücksichtigung aller obigen Erkenntnisse wurde somit ein neuartiger Assay zur Bestimmung von TSHR-Auto-Ab in Patientenseren bzw. -plasmen erhalten, dessen Zuverlässigkeit durch Vermessen eines Kollektivs von Patientenseren überprüft werden konnte, wobei das Zweischritt-Assay-Inkubationsprotokoll (2.1.2) zur Anwendung kam.

3.3.1 Standardkurven

Die Figuren 6 und 7 zeigen die unter Verwendung der Standards gemäß 1.3 erhaltenen Standardkurven bei Verwendung einmal von ¹²⁵I-bTSH (Fig. 6) bzw. von Akridiniumester-markiertem bTSH (Fig. 7). Der Nullstandard ist dabei ein Poolserum von Schilddrüsen-gesunden Menschen; Standards 400 bis 3 sind Mischungen aus Poolseren von Schilddrüsen-gesunden und von Morbus Basedow-Patienten. Die Kalibrierung erfolgte unter Verwendung des

herkömmlichen TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica.

3.3.2 Messung von Patientenseren

5 Unabhängig von der Art der Markierung des bTSH reduzieren TSHR-Auto-Ab die Bindung des markierten bTSH an die Oberfläche der Teströhrchen in konzentrationsabhängiger Weise, wobei schon ab 3 U/l ein deutlich positives Signal feststellbar war.

10 Nach dem beschriebenen Zweischnitt-Assay-Protokoll (2.1.2)
wurden 100 Kontrollseren Schilddrüsen-gesunder und 70 Seren von
Morbus Basedow-Patienten vermessen. Die Ergebnisse sind in Fig.
8 gezeigt. Es ist deutlich die starke Differenzierung zwischen
15 Seren von Patienten mit Morbus Basedow, die TSHR-Auto-Ab
enthalten, und Schilddrüsen-gesunden Kontrollpersonen zu
erkennen.

20 Die Erfindung ermöglicht eine Verbesserung von Verfahren zur
Bestimmung von TSHR-Auto-Ab sowohl im Hinblick auf einen
Ausschluß von physiologischen Störfaktoren, die die Meßergeb-
nisse in bisherigen Assays verfälschen konnten, als auch ins-
besondere in praktischer Hinsicht. Gestützt auf die Lehre in
der vorliegenden Anmeldung ist es erstmals möglich, alle oder
wenigstens die meisten Reagenzien für die Durchführung eines
solchen Verfahrens in gebrauchsfertiger Form herzustellen und
zu Anwendern zur Verfügung zu stellen (z.B. in Form vorbeschich-
teter Teströhrchen und standardisierter, serumfreier Markie-
rungsreagenzien).

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TSHR-Auto-Ab) in einer biologischen Probe mit Hilfe eines Rezeptorbindungsassays, bei dem man die Probe mit (i) einem TSH-Rezeptor-Präparat (TSHR-Präparat) und (ii) markiertem bovinem TSH (bTSH) umsetzt, und bei dem man die Anwesenheit und/oder
10 Menge der zu bestimmenden TSHR-Auto-Ab in der biologischen Probe auf der Basis der gebundenen Menge an markiertem bTSH in dem von der flüssigen Phase abgetrennten Komplex aus bTSH bzw. TSHR-Auto-Ab mit dem TSHR ermittelt,
15 **dadurch gekennzeichnet, daß** man als TSHR-Präparat einen funktionalen rekombinanten TSH-Rezeptor (rTSHR) verwendet, der mit Hilfe eines selektiven Antikörpers gegen den TSH-Rezeptor (Anti-TSHR-Ab) an eine feste Phase gebunden, im gebundenen Zustand durch Waschen gereinigt und auf diese Weise in einen
20 affinitätsgereinigten immobilisierten rTSHR (rTSHR(imm)*) überführt wurde.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als funktionalen rekombinanten TSH-Rezeptor einen funktionalen rekombinanten humanen TSH-Rezeptor (rhTSHR) verwendet und als selektiven Antikörper wenigstens einen monoklonalen Antikörper gegen den humanen TSH-Rezeptor (Anti-hTSHR-mAb) verwendet.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als feste Phase die Wände von Teströhrchen verwendet, die mit einem tierspezifischen Antikörper zur Bindung des Anti-TSHR-Ab vorbeschichtet sind.
- 35 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der monoklonalen Antikörper ein monoklonaler Antikörper gegen den humanen TSH-Rezeptor (Anti-hTSHR-mAb) ist, der nur konformationelle Strukturen des

rhTSHR erkennt, wie er nach der Technik der Immunisierung mit einem DNA-Konstrukt erhältlich ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß man den Rezeptorbindungsassay als Einschritt-Assay in einem mit einem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* beschichteten Teströhrchen durchführt, bei dem man durch Pipettieren (i) der serumhaltigen Probe und (ii) einer Pufferlösung, die das markierte bTSH-Präparat enthält, eine einzige Reaktionslösung herstellt, diese nach einer Inkubation für einen ausreichenden Zeitraum aus dem Teströhrchen entfernt, das Teströhrchen wäscht und die an die Wände des Teströhrchens gebundene Markierung auf an sich bekannte Weise mißt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß man den Rezeptorbindungsassay als Zweischnitt-Assay in einem mit einem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* beschichteten Teströhrchen durchführt, bei dem man (i) im ersten Schritt nur die Probe und einen Puffer pipettiert, inkubiert, danach dekantiert und die Teströhrchen wäscht und (ii) im zweiten Schritt eine Pufferlösung, die das markierte bTSH-Präparat enthält, in das Teströhrchen gibt, nach einer Inkubation für einen ausreichenden Zeitraum die flüssige Phase aus dem Teströhrchen entfernt, das Teströhrchen wäscht und die an die Wände des Teströhrchens gebundene Markierung auf an sich bekannte Weise mißt.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man es in automatisierter Form durchführt, wobei man als Festphase suspendierte Partikel verwendet, die mit einem selektiven Anti-TSHR-Ab beschichtet sind, und daß man die Präparation des rTSHR und die Probe so zusetzt, daß zeitweise eine beide genannten Assaykomponenten enthaltende Probenlösung gebildet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man denjenigen Schritt, bei dem eine

Bindung von markiertem bTSH an den rhTSHR(imm)* erfolgt, in Gegenwart eines sulfatgruppenhaltigen Polysaccharids durchführt.

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man das markierte bTSH im zweiten Schritt in einer serumfreien Pufferlösung zugibt, die wenigstens einen bindungsfördernden Zusatz enthält, der ausgewählt ist aus (i) einer niedermolekularen Fraktion eines Humanserums mit einem Molekulargewicht von weniger als 10.000 d, (ii) einem oder mehreren der Bestandteile, die in einer solchen Humanserumfraktion vorkommen, und (iii) zweiwertigen Metallionen oder aus Gemischen der genannten bindungsfördernden Zusätze gemäß (i), (ii) und (iii).
- 10
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallionen ausgewählt sind aus der Gruppe der Ionen von Erdalkalimetallen oder zweiwertigen Manganionen.
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Umsetzung der Probe mit dem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* in Gegenwart mindestens eines Antikörpers gegen humanes TSH (Anti-hTSH-Ab) durchführt.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 11 in Rückbeziehung auf Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine Antikörper gegen humanes TSH so ausgewählt ist, daß er nicht mit bovinem TSH kreuzreagiert.
- 30 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die zu bestimmenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper rezeptorstimulierende Autoantikörper sind, deren Auftreten in einem Humanserum für den Morbus Basedow charakteristisch ist.
- 35 14. Verfahren zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TSHR-Auto-Ab) in einer biologischen Probe mit Hilfe eines Rezeptorbindungsassays, bei dem man die Probe mit (i) einem TSH-

Rezeptor-Präparat (TSHR-Präparat) und (ii) markiertem bovinem TSH (bTSH) umgesetzt, und bei dem man die Anwesenheit und/oder Menge der zu bestimmenden TSHR-Auto-Ab in der biologischen Probe auf der Basis der gebundenen Menge an markiertem bTSH in dem von der flüssigen Phase abgetrennten Komplex aus bTSH bzw. TSHR-Auto-Ab ermittelt,

dadurch gekennzeichnet, daß man den Rezeptorbindungsassay als Zweischnitt-Assay in einem Teströhrchen durchführt, das mit einem affinitätsgereinigten rhTSHR(imm)* oder einem immobilisierten Fusions-rhTSHR beschichtet ist, bei dem man (i) im ersten Schritt eine Probe, die einen Zusatz eines Anti-hTSH-Antikörpers enthält, und einen Puffer pipettiert, inkubiert, danach die flüssige Phase aus dem Teströhrchen entfernt und die Teströhrchen wäscht und (ii) im zweiten Schritt eine serumfreie Pufferlösung, die das markierte bTSH-Präparat sowie eine niedermolekulare Serumfraktion oder einzelne Bestandteile einer solchen Humanserumfraktion und/oder Metallionen sowie Heparin enthält, in das Teströhrchen gibt, nach einer Inkubation für einen ausreichenden Zeitraum die flüssige Phase aus dem Teströhrchen entfernt, das Teströhrchen wäscht und die an die Wände des Teströhrchen gebundene Markierung auf an sich bekannte Weise mißt.

15. Reagenziensatz zur Durchführung eines kompetitiven Rezeptorbindungsassays nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß er, neben weiteren üblichen Komponenten eines derartigen Reagenziensatzes, wenigstens enthält:

- (i) mit einem rhTSHR in Form eines affinitätsgereinigten immobilisierten rhTSHR oder eines immobilisierten Fusions-TSHR beschichtete Teströhrchen,
- (ii) markiertes TSH oder einen markierten spezifischen TSH-Rezeptor-Antikörper in einer serumfreien Pufferlösung, die eine niedermolekulare Humanserumfraktion oder wenigstens einen ihrer Bestandteile und/oder zweiwertige Metallionen enthält.

M 19.02.99

- 47 -

- 5 16. Verwendung einer niedermolekularen Fraktion eines Human-serums, eines oder mehrerer einzelner Bestandteile, die in einer solchen Humanserumfraktion vorkommen, von zweiwertigen Metallionen und/oder von sulfatgruppenhaltigen Polysacchariden zur Verstärkung der Bindung von TSH an einen TSH-Rezeptor in einem Rezeptorbindungsassay.

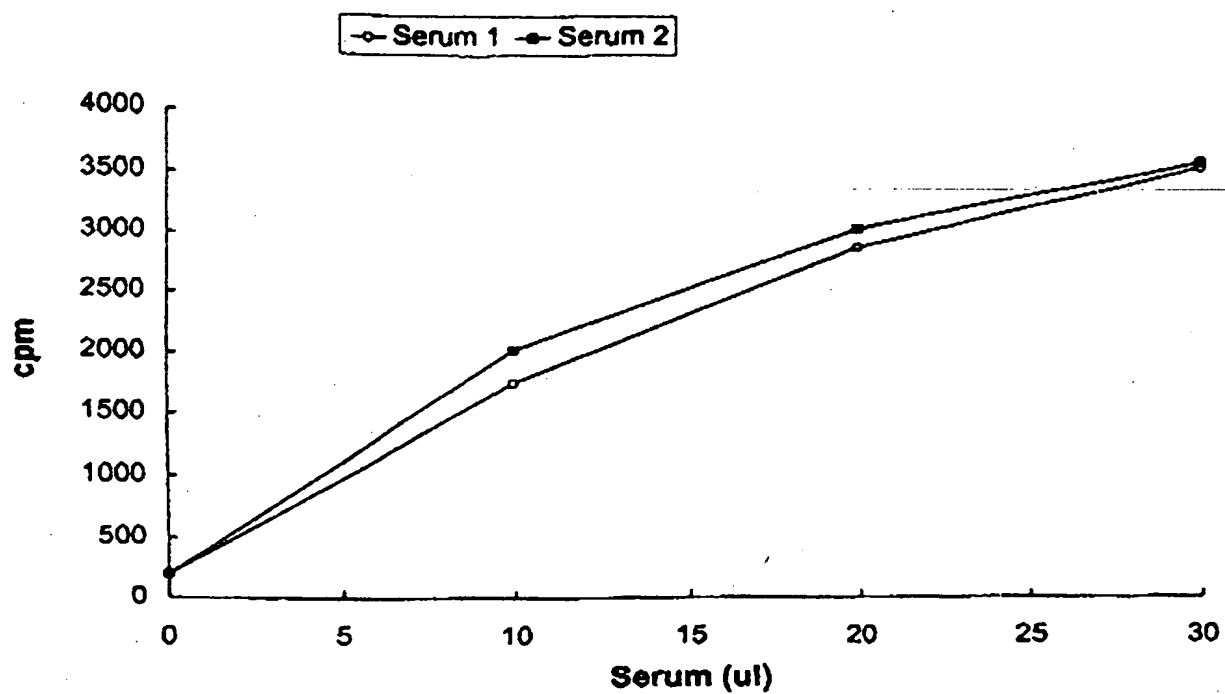
Zusammenfassung

5 **Rezeptorbindungsassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern sowie Reagenzien und Reagenziensatz für die Durchführung eines solchen Rezeptorbindungsassays**

10 Verbesserte Rezeptorassays zum Nachweis von TSHR-Auto-Ab nutzen
 immobilisierte, affinitätsgereinigte rTSHR-Präparate als
 spezifischen Binder. Dadurch sowie durch neue Maßnahmen zur
 Förderung der Bindung des als Tracer verwendeten bTSH an die
 rTSHR-Präparate (Zusatz bindungsauslösender Substanzen wie
 15 Metallsalze und ggf. Heparin) bzw. zur Neutralisierung
 pathologisch erhöhter hTSH Spiegel in den Seren (Zusatz von
 Anti-hTSH-Ab) und/oder zur Eliminierung des Einflusses von
 Anti-bTSH-Ab (durch eine Zweischnitt-Protokoll) wird die Zuver-
 lässigkeit von Assays der genannten Art erhöht, und es eröffnet
 20 sich die Möglichkeit, die Assaybestandteile in gebrauchsfertiger und/oder gut standardisierter Form, auch für eine automatische Abarbeitung, herzustellen und in den Verkehr zu bringen.

M 19.02.99

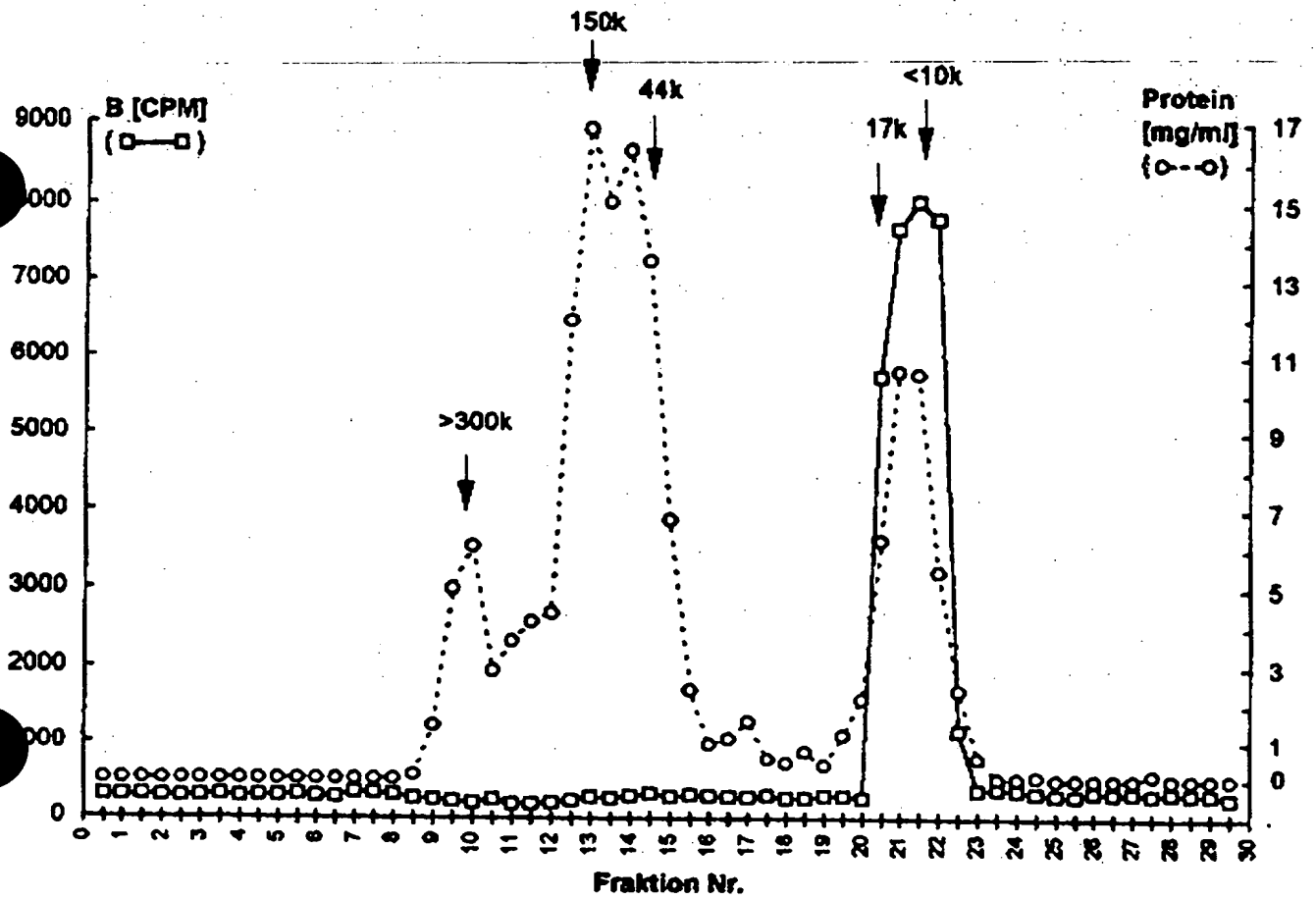
1/8



Figur 1

M 19.02.99

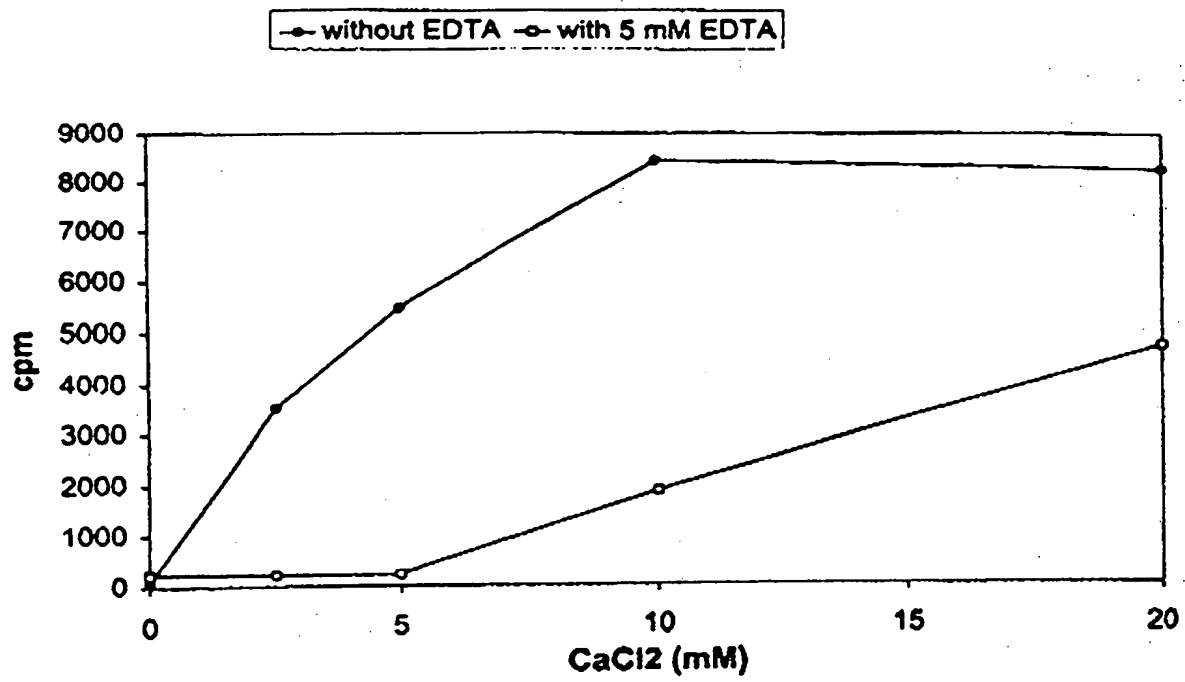
2/8



Figur 2

M 10.02.99

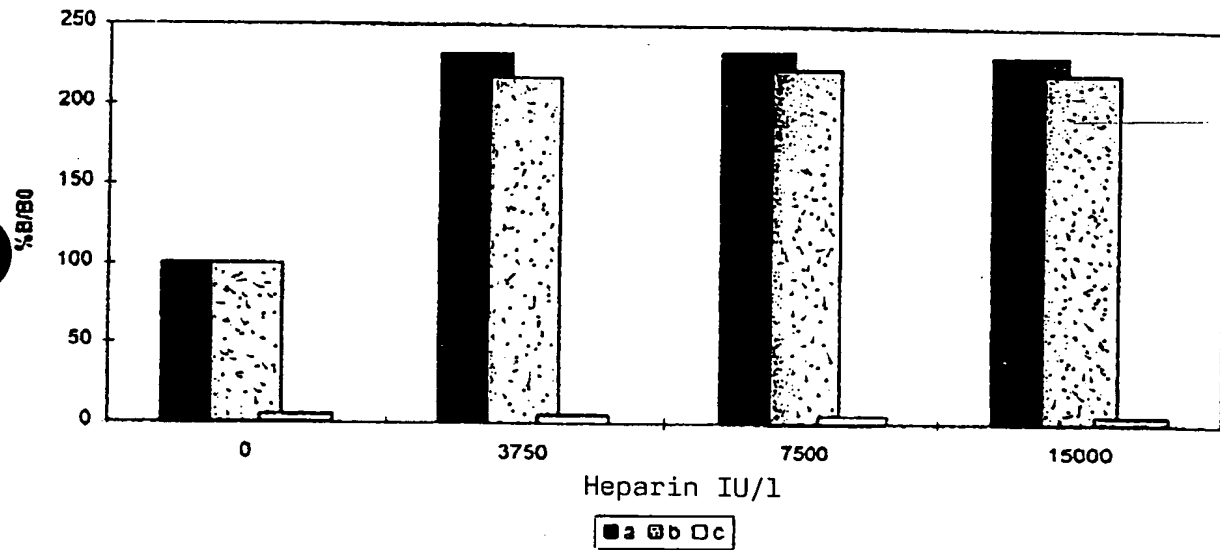
3/8



Figur 3

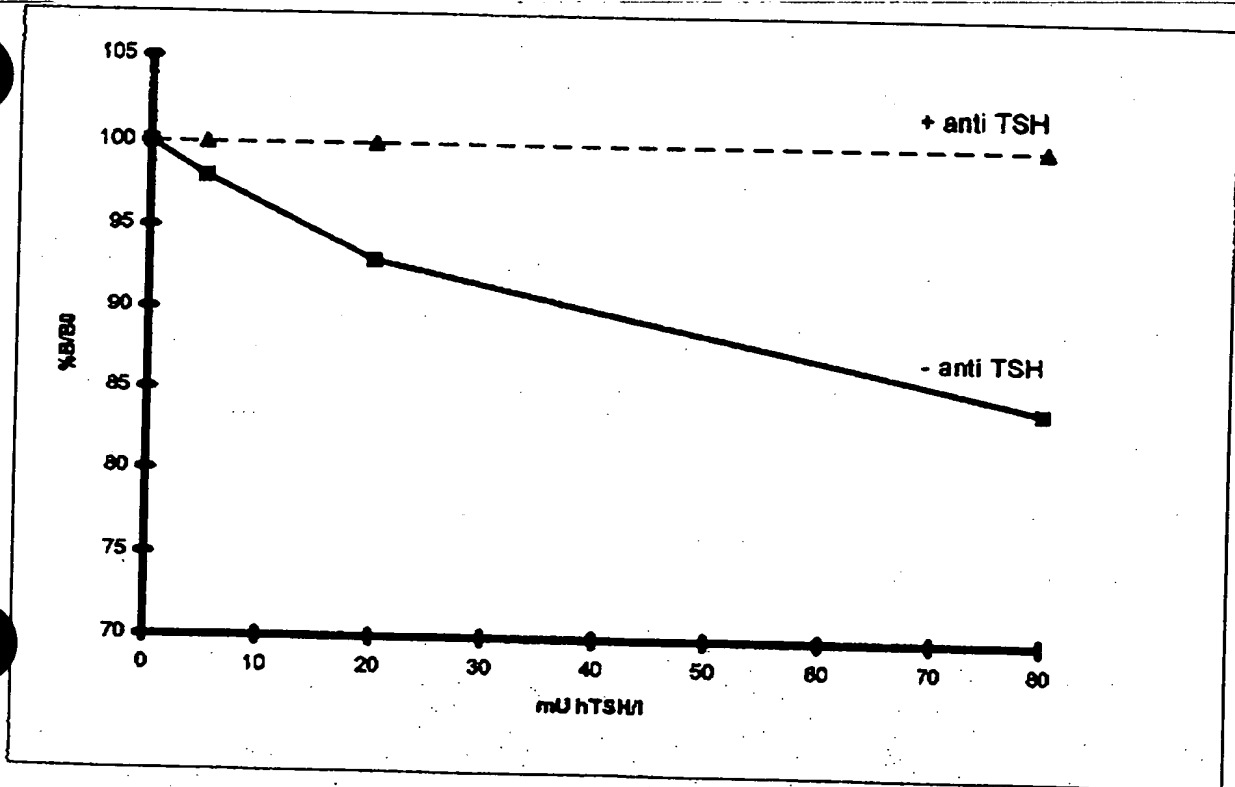
M 19.00.99

4/8



Legende: a = CaCl₂ in HEPES
b = Serum in HEPES
c = HEPES

Figur 4

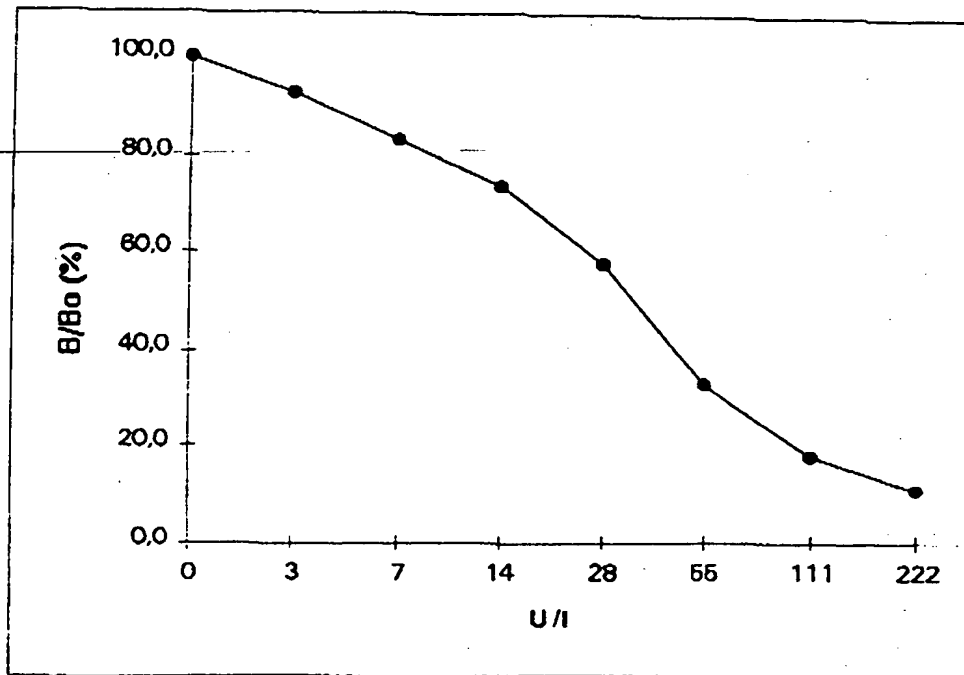


Figur 5

M 19.02.99

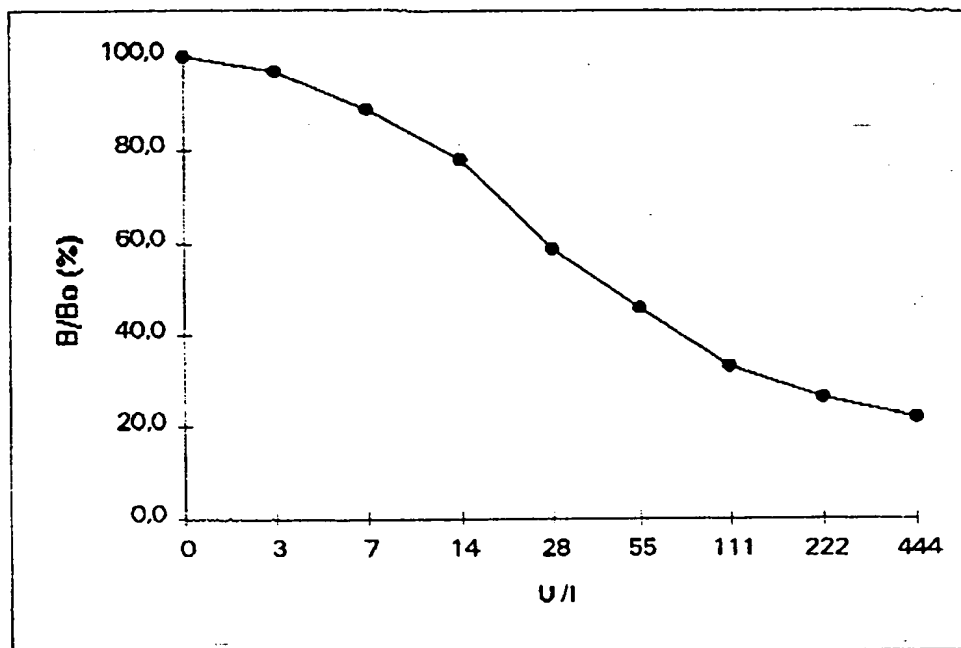
6/8

Standardkurve TRAK-CT unter Verwendung von I-125-b-TSH markiertem bTSH



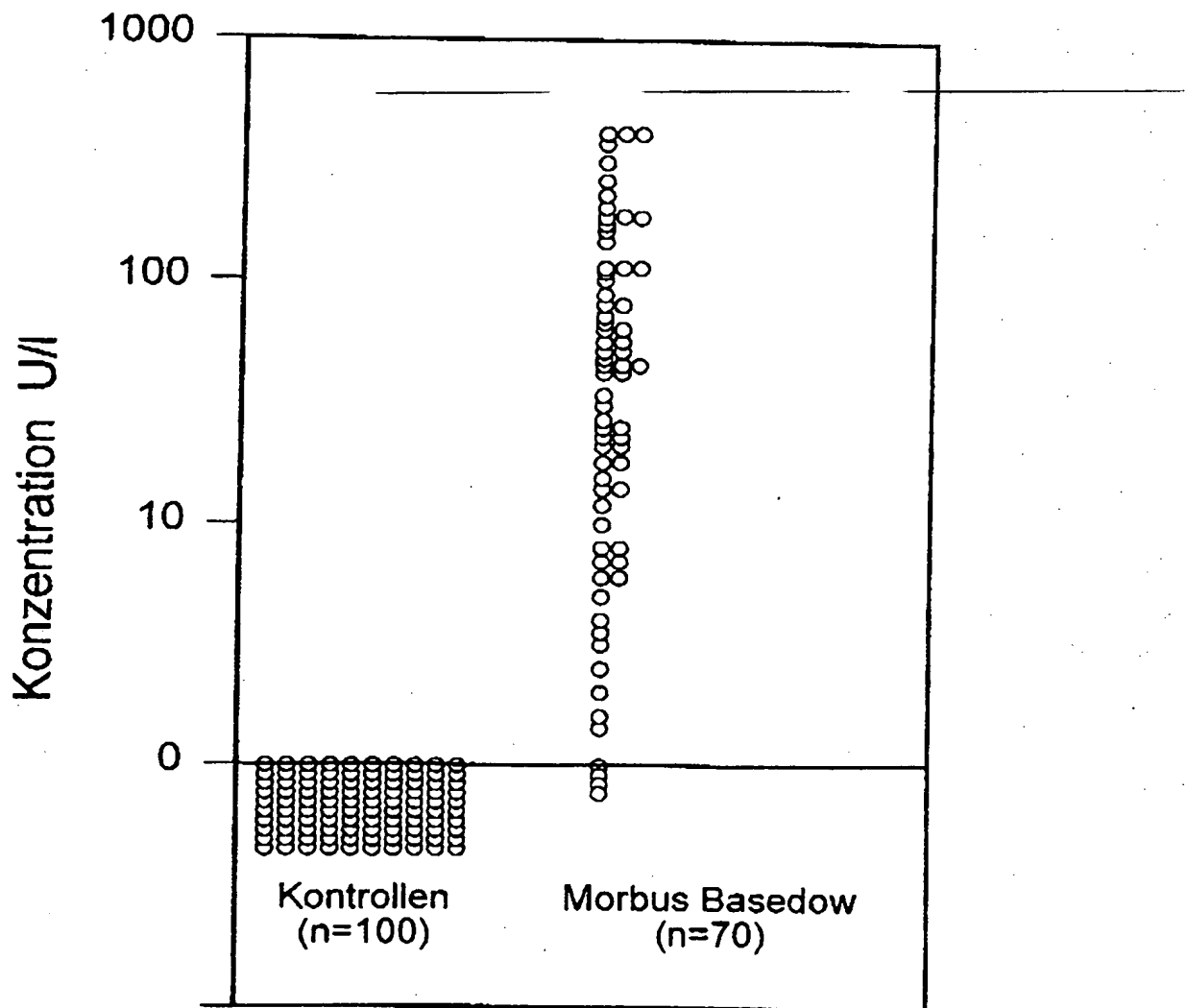
Figur 6

Standardkurve TRAK-CT unter Verwendung von Akridiniumester



Figur 7

11.19.00.99
8/8



Figur 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)